



“Composición de los infiltrados celulares en las biopsias de  
órganos trasplantados y su relación con el rechazo del injerto”

Tesis Doctoral

Elena Aguado Domínguez

Sevilla, 2018



Memoria presentada por Elena Aguado Domínguez para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), bajo la supervisión de la Doctora Isabel Aguilera García y el Doctor Antonio Núñez Roldán, gracias a las siguientes ayudas de financiación públicas:

Proyecto de Investigación en Salud, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto en Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, PI10/2332. Titulado “Caracterización de nuevas dianas antigénicas implicadas en el rechazo de los trasplantes de órganos sólidos y en la enfermedad de injerto contra huésped en el trasplante de progenitores hematopoyéticos”.

Proyecto de Investigación en Salud, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto en Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, PI11/0857. Titulado “Hepatitis inmune *de novo* en trasplante de hígado pediátrico”.

Proyecto de Investigación de Excelencia de la Consejería de Economía y Conocimiento, Junta de Andalucía, CTS-7846. Titulado “Bases moleculares del rechazo mediado por anticuerpos en los trasplantes de órganos sólidos”.







Dr. D. Antonio Núñez Roldán, Catedrático de la Universidad de Sevilla y Jefe de Servicio del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “**Composición de los infiltrados celulares en las biopsias de órganos trasplantados y su relación con el rechazo del injerto**” ha sido realizado bajo su dirección y tutela académica por Elena Aguado Domínguez, que presenta para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 3 de septiembre de 2018.

Fdo. D. Antonio Núñez Roldán,  
Director y Tutor de la tesis doctoral



Dra. Dña. Isabel Aguilera García, Doctora en Biología e Investigadora Nicolás  
Monardes del Instituto de Biomedicina de Sevilla

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “**Composición de los infiltrados celulares en las biopsias de órganos trasplantados y su relación con el rechazo del injerto**” ha sido realizado bajo su dirección por Elena Aguado Domínguez, que presenta para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 3 de septiembre de 2018.

Fdo. Dña. Isabel Aguilera García,

Directora de la tesis doctoral



*A mis padres*



## Índice

<b>Introducción</b>	14
Introducción histórica al trasplante	15
La respuesta inmunitaria al aloinjerto	17
El sistema HLA	18
Sistemas menores de histocompatibilidad y GSTT1	20
Donación y selección de un órgano para el trasplante	22
Mecanismos iniciales del rechazo en el trasplante	24
Tipos de rechazo	27
Criterios diagnósticos de rechazo en el trasplante renal	31
Criterios diagnósticos de rechazo en el trasplante hepático	37
La hepatitis inmune <i>de novo</i> o rechazo rico en células plasmáticas	41
El tratamiento inmunosupresor	42
La biopsia	43
El análisis de la composición de los infiltrados celulares de la biopsia	45
<b>Hipótesis y objetivos</b>	48
<b>Publicaciones</b>	52
Publicación 1	53
Publicación 2	68
Publicación 3	82
Publicación 4	95
<b>Resumen de resultados y discusión</b>	99
<b>Conclusiones</b>	113
<b>Bibliografía</b>	117

<b>Anexos</b> .....	128
Anexo 1: Material suplementario de las Publicaciones .....	129
Material suplementario de la Publicación 1 .....	130
Material suplementario de la Publicación 2 .....	134
Anexo 2: Comunicaciones a congresos .....	141
<b>Abreviaturas</b> .....	145



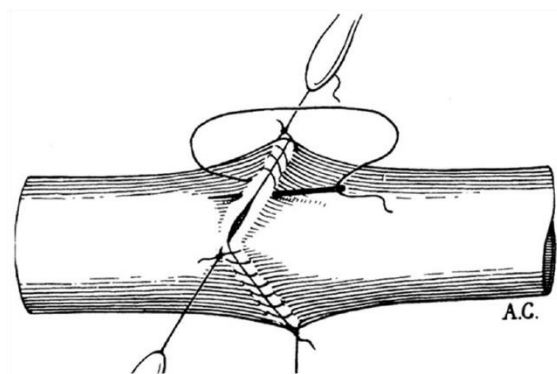


## Introducción

## Introducción histórica al trasplante

El trasplante de órganos constituye en la actualidad la opción terapéutica de elección para muchos pacientes con enfermedades terminales y es uno de los grandes logros de la medicina del siglo XX. Su éxito reside en la combinación de grandes avances en técnicas quirúrgicas, en el descubrimiento de avanzados fármacos inmunosupresores que hacen posible que el receptor tolere el órgano trasplantado y en una minuciosa coordinación médica entre diferentes equipos y hospitales.

Uno de los hitos más importantes que permitió que se desarrollaran las técnicas quirúrgicas necesarias en el trasplante fue el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de suturas vasculares (Figura 1). Ocurrió a principios del siglo XX de la mano de, entre otros, Alexis Carrel, lo que le valió el premio Nobel de Medicina en 1912 <sup>1</sup>. Este nuevo método de sutura vascular sigue siendo utilizado en nuestra época, con muy pocas variaciones.



**Figura 1.** Esquema de sutura vascular desarrollada por Carrel, Nobel de Medicina en 1912. Fuente *Société Nationale de Médecine de Lyon*.

Otro de los grandes hitos en la historia del trasplante ha sido el desarrollo de fármacos inmunosupresores, que veremos con más detalle en el apartado “El tratamiento inmunosupresor”, así como el descubrimiento de los antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés *Human Lukocyte Antigen*), meritorio del Nobel de Medicina en 1980 a Benacerraf, Dausset y Snell <sup>2</sup>. El sistema HLA está constituido por un conjunto de proteínas polimórficas de membrana de autorreconocimiento que presentan gran variedad de unas personas a otras debido a la gran cantidad de alelos existentes, que explicaremos con más detenimiento en el apartado “El sistema HLA”.

El trasplante comienza su camino en España durante la década de los sesenta, cuando un equipo médico del Hospital Clínico de Barcelona y otro de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid se lanzan a hacer estas intervenciones con aloinjertos renales, abriendo un nuevo camino para numerosos pacientes cuya única opción era la diálisis. En concreto, el primer trasplante renal se llevó a cabo en Barcelona en abril de 1965 y en ese mismo año se realizó el primero en Madrid. Esta década constituyó un periodo de consolidación con una mejora notable en la práctica hospitalaria respecto a métodos de mantenimiento de la actividad cardiopulmonar, estableciéndose el concepto de muerte cerebral y disminuyendo la pérdida de posibles donantes. El número de trasplantes desde entonces ha ido aumentando de manera extraordinaria. Hasta octubre de 2004, fecha del 25 aniversario de la Ley de Trasplantes, en España se habían realizado más de 35000 trasplantes renales, más de 11000 hepáticos y más de 27000 de progenitores hematopoyéticos, según datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT). Como ejemplo, en el año 2013, se realizaron un total de 2552 trasplantes renales y 1093 hepáticos, según los últimos datos disponibles en la página web de la ONT. De todos ellos, 412 trasplantes renales y 195 hepáticos se llevaron a cabo en Andalucía, siendo en el Hospital Universitario Virgen del Rocío 95 y 74, respectivamente. Si miramos atrás, desde 1989 hasta 2013, en Andalucía se han realizado 7532 trasplantes renales y 3193 hepáticos.

La ONT es el organismo coordinador perteneciente al Ministerio de Sanidad (ahora de Sanidad, Consumo y Bienestar Social) y se organiza a nivel de coordinación nacional, autonómica y hospitalaria. La regulación legal que prosiguió se promulgó en la Ley 30/1979 de 27 de octubre, sobre extracción y trasplante de órganos. Posteriormente, se redactó el Real Decreto (RD) 1825/2009 por el que se aprueba el estatuto de la ONT. Los puntos fundamentales que podemos destacar de esta legislación son: el establecimiento de una muerte encefálica (ME) como equivalente científico legal de muerte, el respeto a la voluntad del fallecido respecto a donar o no sus órganos, la necesidad de que el diagnóstico de ME se haga por un equipo médico independiente al del trasplante, el carácter altruista de la donación, la garantía del anonimato del donante y, finalmente, la aplicación de criterios médicos para la distribución de los órganos disponibles entre los enfermos a espera de los mismos. Desde el 1 de septiembre de 1990, todas las donaciones de órganos registradas en España se coordinan desde la oficina central de la ONT en Madrid.

El éxito de estas intervenciones en pacientes con patologías terminales se ve reflejado en los datos de supervivencia, que en el caso de los pacientes trasplantados de riñón al año del trasplante es del 91% y de los pacientes trasplantados de hígado al año es del 80,7%, según datos de la ONT (según los datos disponibles más recientes del 2016).

### **La respuesta inmunitaria al aloinjerto**

El sistema inmunitario tiene la finalidad de defender al organismo frente a la agresión de parásitos, bacterias y virus y, en el contexto del alotrasplante, el reconocimiento viene determinado por los antígenos no propios que son reconocidos en el tejido injertado. El rechazo del injerto se basa en una respuesta inmunológica del receptor que implica el reconocimiento de antígenos extraños en el órgano trasplantado.

El rechazo es una respuesta inmunitaria adaptativa que cumple todas sus características, es decir, es específica, ya que permite discriminar y responder de manera precisa ante cualquier molécula extraña; es diversa, ya que permite al sistema inmune responder a una amplísima variedad de moléculas extrañas; tiene especialización, porque genera respuestas adecuadas frente a diferentes estímulos; tiene memoria, dando lugar a respuestas más enérgicas cuando se enfrenta de nuevo con un mismo agente; es autolimitada, porque permite que el sistema inmune recupere su estado basal una vez que la respuesta ya haya conseguido su objetivo; y no es autorreactiva, ya que discrimina lo propio de lo extraño, mostrando tolerancia frente a lo propio y reaccionando frente a lo extraño.

Así, el rechazo implica el reconocimiento de antígenos extraños en los tejidos por parte de los linfocitos y anticuerpos del paciente receptor, con el consecuente daño al injerto. A la respuesta inmune que conduce al rechazo contribuyen tanto factores del donante como del receptor. El factor más importante en el donante es la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Mayor Histocompatibility Complex*; o HLA en humanos, del inglés *Human Lukocyte Antigen*) en los tejidos y la presencia de células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *antigen presenting cell*) en el injerto trasplantado. En el receptor, destaca la sensibilización previa contra antígenos AB0 y HLA expresados en el injerto.

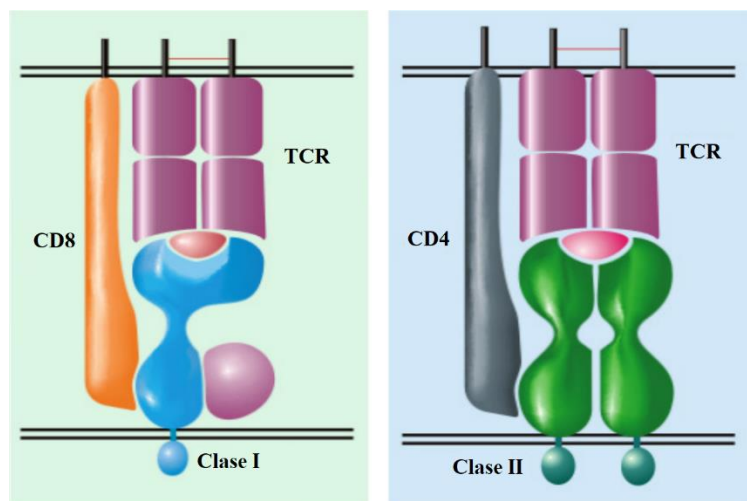
## El sistema HLA

El sistema HLA forma parte del complejo de presentación de antígenos a la célula T. El polimorfismo de estas moléculas constituye un sofisticado sistema de defensa. Las moléculas del sistema HLA son de dos tipos: las de clase I y las de clase II.

Las moléculas de HLA de clase I están codificadas por los locus HLA-A, HLA-B y HLA-C. Éstas constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente, siendo una cadena pesada o cadena  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) y una ligera denominada  $\beta 2$ -microglobulina. Los dominios  $\alpha 3$  y  $\beta 2$ -microglobulina tienen similar plegamiento al de las inmunoglobulinas (Ig) y los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se pliegan para formar una hendidura, que es el sitio de unión del péptido. Las moléculas HLA de clase I presentan péptidos de antígenos intracelulares a linfocitos T  $CD8^+$  citotóxicos y están presentes en todas las células del organismo excepto en los hematíes.

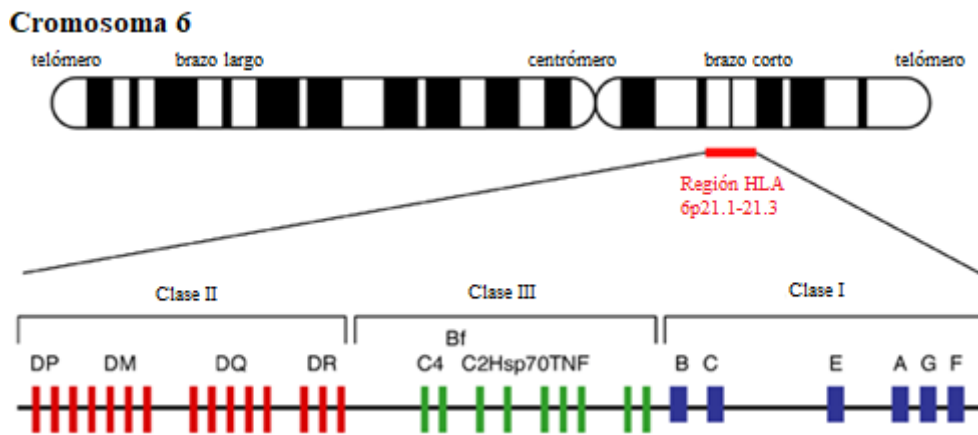
Las moléculas de HLA de clase II son HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, codificadas por los locus DRB1, DPB1 y DQB1. Están compuestas por dos cadenas pesadas unidas de forma no covalente, siendo una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  pertenecen a la familia de las Ig y los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  se pliegan para formar la hendidura donde se inserta el péptido. Así pues, la hendidura está formada por dominios de cadenas distintas. Su función es la de presentar péptidos procedentes del fraccionamiento de proteínas exógenas a linfocitos T  $CD4^+$  y se expresan sólo en algunas APCs como son: linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, algunos endotelios, etc.

El linfocito T reconoce el complejo formado por el péptido y la molécula de HLA a través de su receptor de linfocito T (TCR, del inglés *T-Cell Receptor*) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de la estructura de reconocimiento entre un linfocito T, en la parte superior, con su TCR y moléculas CD4 o CD8; y la molécula HLA de clase I y II, en la parte inferior.

Los genes del sistema HLA se encuentran en una región localizada en el brazo corto del cromosoma 6, que abarca un segmento bastante extenso, unas 4 Mb (Figura 3). El sistema HLA se caracteriza por ser poligénico y polimórfico. Es poligénico ya que sus proteínas se expresan codominantemente y es polimórfico porque cada locus es ocupado por decenas de alelos diferentes que dan lugar a proteínas antigénicamente distintas, siendo además el sistema génico más polimórfico del genoma. De algunos genes HLA se conocen más de 2000 alelos y algunos codifican más de 1500 proteínas distintas. Estos alelos se heredan de padres a hijos en bloque ya que presentan gran desequilibrio de ligamiento. El bloque de alelos heredado de cada uno de los progenitores se denomina haplotipo, lo que origina que cada individuo posea dos alelos, uno del padre y otro de la madre, para cada uno de los locus.



**Figura 3.** Representación gráfica del cromosoma 6 humano, donde se encuentra la región codificante del sistema HLA y la distribución de sus genes. Adaptado de *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003.

Las proteínas del sistema HLA son fácilmente reconocibles como extrañas por el sistema inmune de otro individuo debido a su elevado polimorfismo y desencadenan una respuesta de rechazo por su expresión en membrana y por su función de molécula presentadora.

El avance en los últimos años en las técnicas de tipaje HLA ha permitido mejorar la caracterización de los pacientes previa al trasplante. La existencia de ensayos de alta resolución, que son específicos y sensibles, permite conocer con fiabilidad el repertorio HLA del paciente receptor y del donante.

### **Sistemas menores de histocompatibilidad y GSTT1**

Además del mencionado sistema HLA, existen otros sistemas denominados menores que hacen que la histocompatibilidad perfecta entre donantes no exista, salvo en hermanos gemelos univitelinos.

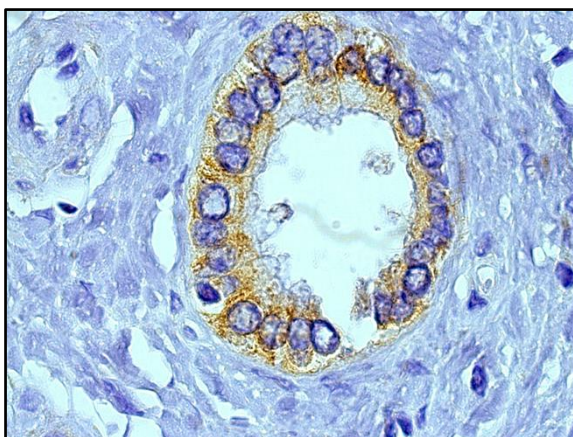
Los sistemas menores de histocompatibilidad son consecuencia de la existencia de polimorfismos presentes en el genoma. Los polimorfismos de un único nucleótido o SNP, de sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*, hacen que un cambio simple en la secuencia dé lugar a distintos alelos para un mismo gen. La frecuencia de estos cambios de un solo nucleótido en la población tiene que ser al menos del 1%. También pueden ser inserciones o delecciones de una sola base en mitad de una



secuencia. Los SNPs son responsables de la mayor parte de la variabilidad genética existente entre individuos. Además, otro tipo de polimorfismo viene determinado por la delección completa de la secuencia codificante para alguna proteína, lo que se denomina alelo nulo. Estos alelos nulos están presentes en la población sin afectar en ningún sentido a la supervivencia del individuo.

En el contexto del trasplante y de la compatibilidad entre donante y receptor, los productos génicos fruto de estos polimorfismos pueden actuar como dianas de reconocimiento del sistema inmune si se expresan en órganos como el hígado o el riñón. Un claro ejemplo es la expresión de la enzima glutatión S-transferasa T1 (GSTT1).

La GSTT1 es una proteína citosólica de 29 kDa de peso molecular altamente expresada en hígado (Figura 4) y en menor medida en otros órganos y tejidos como riñón, eritrocitos, paratiroides o próstata. Esta proteína está codificada por un solo gen, pertenece a una familia de enzimas relacionadas con la detoxificación de fármacos y tiene funciones relacionadas con la eliminación de metabolitos de especies reactivas de oxígeno <sup>3</sup>. En la población general caucásica, existe un 20% que presenta en homocigosis el alelo nulo del gen que codifica esta enzima <sup>4</sup>. Dado que existen enzimas con funciones similares, ésto no supone una desventaja evolutiva, salvo en la situación particular en la que un paciente con genotipo nulo para la GSTT1 reciba un órgano trasplantado de un donante positivo para esta misma proteína. En este contexto, el paciente receptor reconoce a la proteína expresada en el injerto recibido como extraña y es capaz de desencadenar una respuesta inmune de rechazo.



**Figura 4.** Expresión de GSTT1 en tejido hepático, en concreto un conducto biliar.

Se ha descrito una respuesta T en la que se identifican linfocitos T que reconocen específicamente al antígeno GSTT1 expresado en el hígado trasplantado <sup>5</sup>, así como una

asociación entre la presencia de anticuerpos específicos anti-GSTT1 y el rechazo mediado por anticuerpos (AMR) en el trasplante de órganos sólidos, tanto en trasplante renal <sup>6-8</sup> como en hepatitis inmune *de novo* (HIdn) tras un trasplante hepático <sup>9,10</sup>. También se ha descrito la producción de anticuerpos anti-GSTT1 en pacientes no trasplantados, con genotipo nulo, tras recibir transfusiones de personas con genotipo positivo o en mujeres con embarazos de fetos positivos <sup>11</sup>.

Esta situación de incompatibilidad en GSTT1 aumenta de forma significativa la posibilidad de que se desarrolle la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) <sup>12</sup>. La detección de anticuerpos anti-GSTT1 está fuertemente asociada a EICH hepática y especialmente a la forma aguda <sup>13</sup>. En el contexto del TPH, hemos descrito por primera vez en uno de los trabajos que componen esta tesis doctoral, el daño inmunológico causado al hígado en el caso de una paciente, tras recibir infusión de células de su hermana, idéntica para HLA pero incompatible para GSTT1. La donante había experimentado sensibilización previa frente a la GSTT1 tras varios embarazos <sup>14</sup>.

### **Donación y selección de un órgano para el trasplante**

Según la ONT, más del 90% de los órganos que se trasplantan en España proceden de donantes fallecidos en situación de muerte encefálica (ME). Ésta se define como el cese irreversible de las funciones de las estructuras neurológicas intracraneales, se comprueba con la ausencia de toda función del sistema nervioso central (SNC) y se justifica por la existencia de un daño estructural irreversible. La ME se puede producir tras un grave daño del SNC, secundario a un traumatismo craneoencefálico, a una hemorragia o infarto cerebral <sup>15</sup>. Estos criterios, así como las pruebas clínicas y exploratorias necesarias, están recogidos en la citada Ley 30/1979 en materia de donación, trasplantes de órganos y tejidos y su correspondiente RD.

Una vez establecido el criterio de ME, es fundamental valorar la idoneidad de los órganos y tejidos para su posible donación, así como una revisión de la historia clínica del paciente fallecido respecto a edad, antecedentes de neoplasias malignas, de enfermedades infecciosas, de enfermedades sistémicas, situación general y hábitos personales. Además, se realiza una exploración clínica completa del posible donante y una evaluación durante el proceso de extracción del órgano. En algunos centros, se

realiza una biopsia pre-trasplante del órgano que se va a trasplantar para valorar algunos aspectos histológicos de tejido que se va a injertar. Algunas lesiones preexistentes en riñones a trasplantar se asocian con la presencia de una peor función renal, con el desarrollo de lesiones crónicas, con una peor supervivencia del injerto <sup>16</sup>, etc.

La realidad actual en la donación de órganos obliga a la optimización del proceso de evaluación del donante, donde intervienen distintas especialidades con profesionales con una formación específica en este campo. En el caso del trasplante renal, se ha establecido una modalidad denominada “criterios expandidos”, en los que los criterios de aceptación del donante de riñón son algo más laxos en algunas características como la edad, siendo aceptados donantes mayores de 60 años o mayores de 50 años y fallecimiento por accidente cerebrovascular, historia de hipertensión arterial o creatinina sérica mayor de 1,5 mg/dl en el momento de la extracción. Otro ejemplo es la denominada “donación en asistolia” y en la que se diferencian donación en asistolia “no controlada”, siendo el caso de fallecidos fuera del hospital por muerte súbita o pacientes que han sufrido una resucitación infructuosa tras una parada cardiaca, y donación en asistolia “controlada”, incluyendo pacientes a los que se aplica limitación del tratamiento de soporte vital tras acuerdo entre el equipo sanitario y familiares o representantes del paciente y pacientes que sufren una parada cardiaca mientras se establece el diagnóstico de ME.

En el contexto del TPH, actualmente la opción mayoritaria es el trasplante de donante emparentado aunque, debido al menor número de hijos en las familias, están aumentando las cifras de donantes no emparentados.

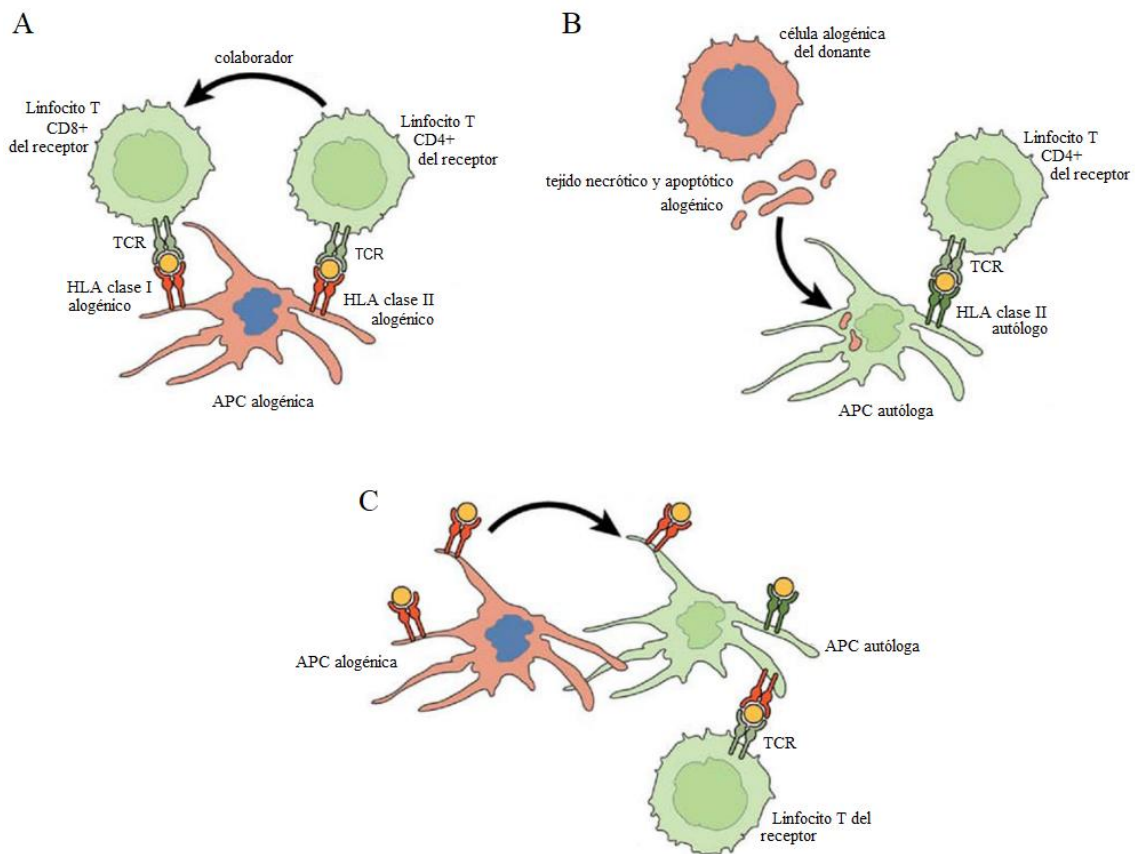
La realidad es que, desafortunadamente, existe una escasez de órganos y de donantes disponibles respecto al número de pacientes actualmente en lista de espera para trasplante. La reducción de la mortalidad por tráfico y por enfermedades cerebrovasculares, unido a los avances en la atención del paciente crítico, está determinando un descenso progresivo en la potencial donación en nuestro país.

El trasplante habitualmente se realiza entre donante y receptor genéticamente diferentes, siendo la incompatibilidad más frecuente y mejor conocida la asociada a antígenos HLA. Las moléculas HLA son las responsables de la mayoría de las reacciones de rechazo del aloinjerto, pero también hay otras muchas moléculas responsables, que

conforman los sistemas menores de histocompatibilidad anteriormente mencionados, entre las que destacamos la GSTT1.

### **Mecanismos iniciales del rechazo en el trasplante**

El rechazo del injerto es una reacción inmunológica del receptor contra la presencia de tejido trasplantado al reconocerlo como no propio y constituye el principal problema en el fracaso del trasplante. En los casos de trasplante de órganos sólidos, durante el proceso quirúrgico se genera daño tisular, así como en la situación de ME. Se producen lesiones asociadas a la isquemia-reperfusión y se liberan citoquinas o quimiocinas, que activan las células endoteliales de la microvasculatura adyacente, aumentando la expresión de moléculas de adhesión en su superficie. Asimismo, se produce la activación del complemento. Los leucocitos circulantes, activados por la acción de citoquinas, ruedan sobre el endotelio activado mediados por las selectinas y se adhieren firmemente a la superficie de la membrana endotelial mediados por integrinas. Estos pasos son necesarios para la diapédesis y la extravasación de los leucocitos efectores en el tejido inflamado. Los leucocitos infiltrados se activan e incrementan la producción local de mediadores inflamatorios. Estos linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  reconocen mediante su TCR a los péptidos extraños cargados en moléculas HLA en la superficie de las APC alogénicas (Figura 5A). Los macrófagos infiltrados fagocitan el tejido necrótico y apoptótico alogénico, procesándolo y exponiendo algunos de sus péptidos en la superficie de moléculas HLA de clase II, en lo que sería una presentación indirecta de los epítomos reconocidos como extraños a linfocitos T  $CD4^+$  (Figura 5B). En una vía semidirecta, las células dendríticas autólogas, mediante contacto directo con las APC alogénicas, adquieren de éstas moléculas HLA intactas, originando una célula quimérica en HLA que también activa a linfocitos T que reconocen estos antígenos extraños (Figura 5C) <sup>17</sup>.

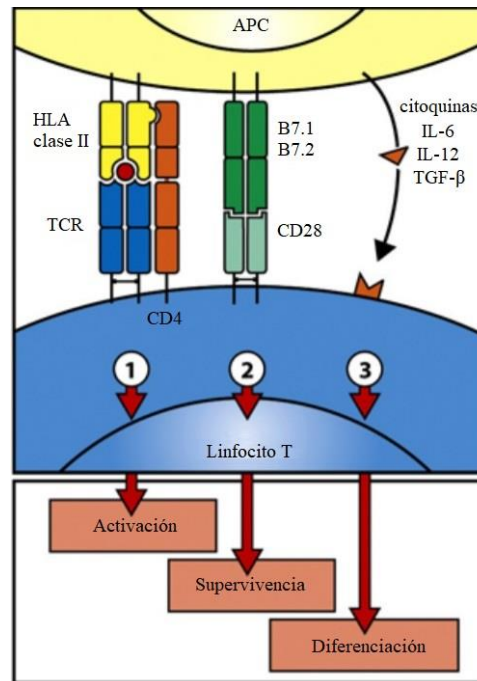


**Figura 5.** Presentación y reconocimiento de antígenos del donante por parte de células del receptor. Presentación directa de las APC alógenas con sus HLA en superficie a los linfocitos T con sus TCR (A). Presentación indirecta de los péptidos alógenos en las moléculas HLA de APCs autólogas a los linfocitos T con sus TCR (B). Reconocimiento semi-directo en donde células dendríticas autólogas adquieren moléculas HLA alógenas por contacto directo con otra célula dendrítica alógena. Adaptado de *Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs*, Gastroenterology, 2011.

En el caso del TPH, el rechazo del injerto puede producirse cuando las células del sistema inmune del paciente receptor no han sido eliminadas completamente tras el tratamiento de acondicionamiento previo al trasplante y se desencadena una respuesta frente a las células infundidas.

Las APCs proporcionan 3 tipos de señales al linfocito T: activación, supervivencia y diferenciación (Figura 6). Esta comunicación constituye una verdadera sinapsis inmunológica que activa toda una cascada de transducción de señales en el linfocito T. La diferenciación final del linfocito T depende de la tercera señal, a grandes rasgos será: linfocito T CD8<sup>+</sup> citotóxico, linfocito T CD4<sup>+</sup> colaborador y linfocito T regulador. Los linfocitos T se activan, proliferan y producen células T maduras alorreactivas, que

finalmente son reclutadas en el órgano diana para desencadenar el proceso de rechazo del injerto.



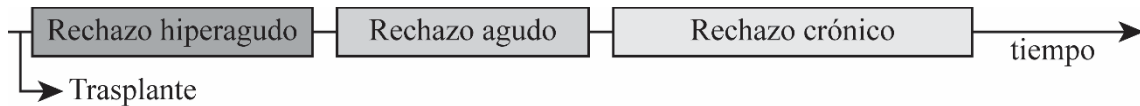
**Figura 6.** Representación de las tres señales que proporcionan las APCs a los linfocitos T. Adaptado de *Janeway's immunobiology, 7th edition, Garland Science*.

Además, las moléculas HLA del donante, así como otros antígenos menores de histocompatibilidad, también pueden ser reconocidos directamente sobre la membrana de las APCs del donante, sin necesidad de procesar el antígeno. Se puede decir que los linfocitos T del receptor reconocen a una molécula HLA extraña como una molécula HLA propia presentando un péptido extraño, desencadenando su activación.

Se da la circunstancia de que el reconocimiento de los antígenos mayores y menores de histocompatibilidad en el TPH, puede generar una respuesta del sistema inmune en otros tejidos del huésped, como es el caso del tejido hepático, que trataremos más adelante.

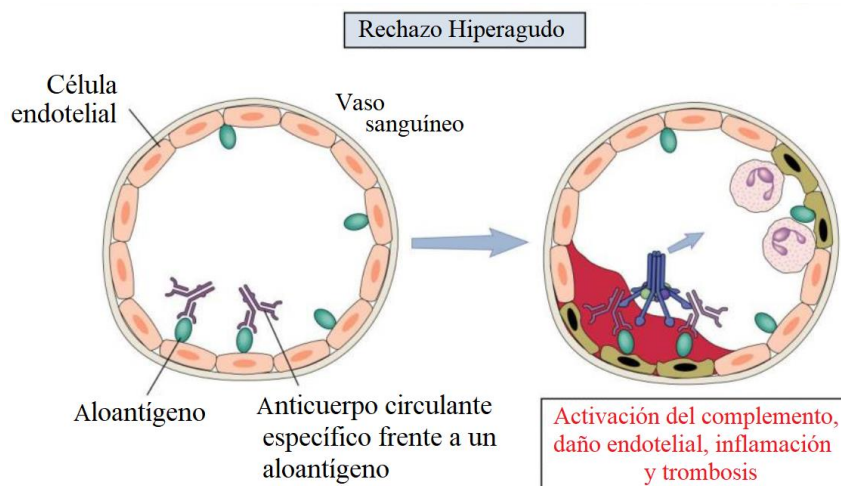
## Tipos de rechazo

Si empleamos el criterio cronológico tras el momento del trasplante para clasificar los tipos de rechazo, generalmente se diferencian rechazo hiperagudo, agudo y crónico, desde la perspectiva más clásica basada en su periodo de aparición inmediato, temprano y tardío, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema temporal donde se aprecian los rechazos más frecuentes según el tiempo post-trasplante transcurrido.

- Rechazo hiperagudo: es un rechazo que ocurre en cuestión de minutos y horas tras el trasplante del órgano. Es un rechazo en el que median anticuerpos preformados contra antígenos presentes en el órgano donado. Histológicamente muestra depósitos de plaquetas y fibrina, activación de la cascada del complemento, ya que los anticuerpos se fijan principalmente a la pared de los capilares, daño endotelial, inflamación, etc. Si se produce este tipo de rechazo, el injerto se puede perder inmediatamente. Debido a la selección de donantes y a la capacidad de detección de anticuerpos específicos en el receptor, esta situación es prácticamente inexistente en la práctica clínica actual.



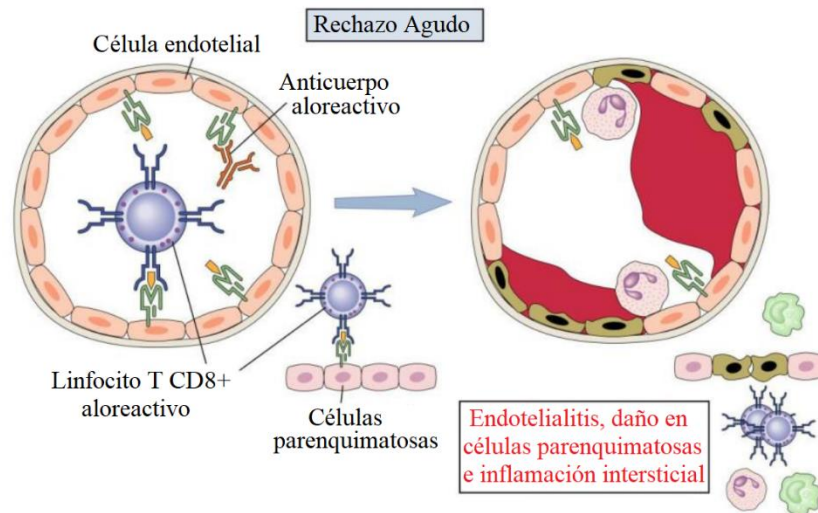
**Figura 8.** Esquema de acontecimientos que ocurren en el rechazo hiperagudo. Adaptado de *Cellular and molecular immunology*, Abbas and Lichtman, 2005, Elsevier.

- Rechazo agudo: suele ocurrir entre 3 y 6 meses tras el trasplante, o tras un cambio en la inmunosupresión del paciente, debido generalmente a un inadecuado régimen inmunosupresor o, más frecuentemente, a consecuencia de una mala adherencia al tratamiento por parte del paciente trasplantado. Dependiendo de si intervienen mayoritariamente linfocitos T o anticuerpos producidos por linfocitos B, podemos clasificar el rechazo agudo en celular o humoral, respectivamente. El primero se produce como consecuencia del reconocimiento por parte de los linfocitos T de antígenos de histocompatibilidad en el donante, lo que activaría la respuesta inmune y el consecuente daño al injerto. El segundo se produce como consecuencia del reconocimiento por parte de anticuerpos, bien preformados o bien desarrollados *de novo* post-trasplante, de antígenos en el tejido injertado, lo que activaría la cascada inflamatoria, mediada o no por complemento, responsable de la disfunción del injerto.

Es posible que el daño del injerto y la consecuente disfunción no sean clínicamente evidentes hasta pasado un tiempo, pero sí lo sea la presencia de un patrón histológico de rechazo agudo. En ese caso hablamos de rechazo agudo subclínico. Su incidencia es variable entre centros pero puede llegar a ser notable, hasta un 30% en los pacientes trasplantados de riñón. Algunos centros trasplantadores, como el Hospital Vall d'Hebron en Barcelona, han establecido un protocolo de seguimiento mediante la realización de biopsias de protocolo entorno al mes 6 post-trasplante, aunque no existe un consenso suficiente como para adoptar este protocolo de seguimiento en las unidades de trasplante renal <sup>18-</sup>

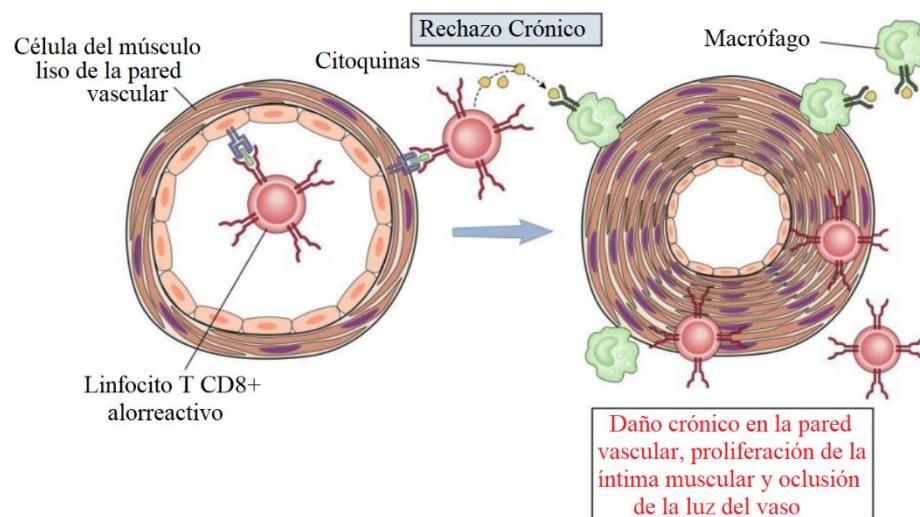
20.





**Figura 9.** Esquema de acontecimientos que ocurren en el rechazo agudo. Adaptado de *Cellular and molecular immunology*, Abbas and Lichtman, 2005, Elsevier.

- Rechazo crónico: clásicamente se ha hablado de que este tipo de rechazo se iniciaba al menos a partir del tercer mes post-trasplante, pero hoy en día se conoce que los mecanismos causantes se ponen en marcha desde el momento del implante, por lo que puede darse en cualquier momento de la evolución del trasplante. Está relacionado con la aparición de fibrosis y alteraciones vasculares, así como con mecanismos inmunológicos. Frecuentemente acaba con la pérdida de la función del injerto y actualmente es la principal causa de pérdida del aloinjerto.



**Figura 10.** Esquema de acontecimientos que ocurren en el rechazo crónico. Adaptado de *Cellular and molecular immunology*, Abbas and Lichtman, 2005, Elsevier.

Por otro lado, el avance en el estudio de la patogenia del rechazo y la incorporación de nuevos parámetros de estudio han hecho posible establecer una clasificación diagnóstica más precisa y rigurosa, donde se reconocen respuestas mediadas por anticuerpos y respuestas mediadas por células T.

- En el AMR o rechazo humoral, los linfocitos B alorreactivos se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos frente a antígenos del donante o DSA, del inglés *donor-specific antibodies*. Mediante la interacción con linfocitos T CD4<sup>+</sup> previamente activados, los linfocitos B experimentan una expansión clonal y se diferencian a las células plasmáticas y células memoria.

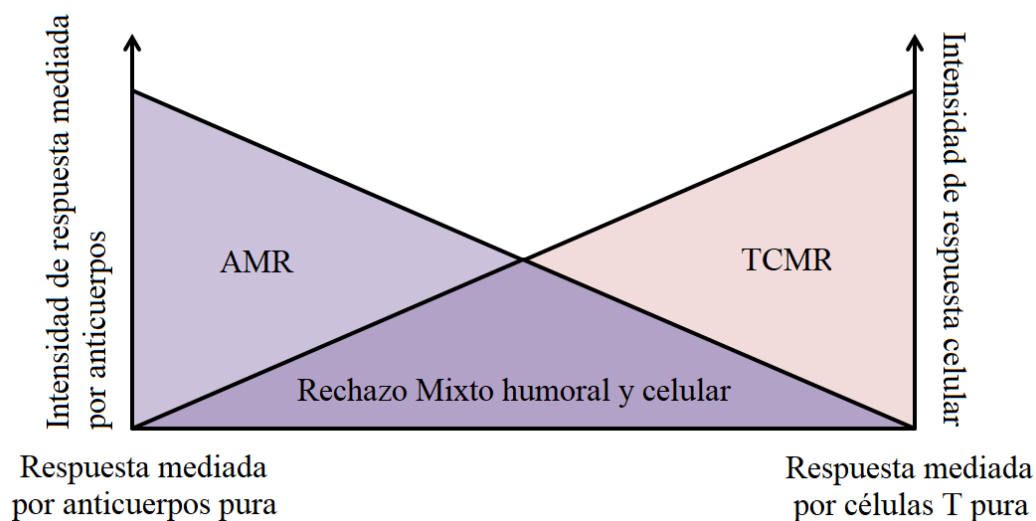
Durante el rechazo humoral, los anticuerpos aloespecíficos anclados al tejido endotelial, activan la vía clásica del complemento y se produce la muerte directa de las células endoteliales, dejando depósitos del compuesto C4d de la ruta del complemento. Debido a que este depósito permanece en el tejido, ya que establece enlaces covalentes con componentes de células endoteliales y con el colágeno de las membranas basales, se ha convertido en un marcador tisular muy relevante en el apoyo al diagnóstico de este tipo de rechazo <sup>21-23</sup>.

Sin embargo, durante años se han ido acumulando observaciones de RMA sin la presencia de depósitos de C4d, que llevaron a importantes publicaciones científicas en las que se asigna el papel fundamental a las células NK y también a los macrófagos. Estos linfocitos NK de la inmunidad innata reconocen a la fracción constante de los anticuerpos anclados al tejido reconocido como extraño y desencadenan una respuesta de ataque con perforinas y granzimas a la célula marcada <sup>24-31</sup>. Este fenómeno se conoce como citotoxicidad dependiente de anticuerpos y llevó a que la presencia de C4d ya no sea un criterio indispensable, aunque parte de los mecanismos moleculares que subyacen continúan aún desconocidos.

- El rechazo celular o mediado por linfocitos T (TCMR) implica una respuesta específica en la que aquellos linfocitos T que se han seleccionado para su multiplicación clonal en el timo y tras la interacción con APCs del donante, maduran y se convierten en células efectoras, que atacan específicamente el aloinjerto.

Las lesiones histológicas que provocan una y otra respuesta presentan características diferentes que los patólogos emplean para determinar el diagnóstico. A pesar de ello,

debemos tener en cuenta que el sistema inmune no se basa en un “todo o nada”, no es una respuesta que se enciende o apaga como si fuera un interruptor, sino que se trata de una respuesta integrada donde realmente existe un solapamiento de respuestas de diferentes naturalezas e intensidades, en las que puede predominar un componente u otro, o en la que incluso ambos componentes pueden estar actuando al mismo tiempo en lo que denominamos rechazo mixto, como se representa en la Figura 11.



**Figura 11.** Representación esquemática de los distintos componentes que pueden estar participando en la respuesta inmune de rechazo en un trasplante. En el eje y izquierdo, se representa la intensidad de la respuesta mediada por anticuerpos. En el eje y derecho, la intensidad de la respuesta mediada por células T. A lo largo del eje x, encontramos un espectro de respuesta de rechazo donde predomina, hacia la izquierda componente humoral y hacia la derecha un componente celular.

Además, la particularidad de cada tipo de órgano hace que la clasificación del rechazo sea específica de cada uno de ellos, por lo que comentaremos los criterios diagnósticos empleados en el trasplante renal y hepático.

### Criterios diagnósticos de rechazo en el trasplante renal

En 1991, se reunieron por primera vez un grupo de patólogos, nefrólogos y cirujanos de trasplante de todo el mundo con el objetivo de establecer un esquema de consenso internacional para la nomenclatura, la interpretación de los criterios histológicos del

rechazo y la valoración de la respuesta terapéutica del trasplante renal. De esta manera, se establecieron los criterios internacionales en el diagnóstico histológico del rechazo del trasplante renal o criterios de Banff<sup>32</sup>, por el lugar donde tuvo lugar esta reunión, en Banff, Canadá. Estos criterios se publicaron en 1993 y son revisados periódicamente.

En la actualización de 1997, se publicó una relación de seis categorías diagnósticas para las biopsias de trasplante renal: normal, AMR, cambios *borderline*, rechazo agudo, nefropatía crónica del injerto y otros cambios no considerados secundarios a rechazo<sup>28</sup>. Mientras que en 2005 la categoría de rechazo agudo fue sustituida por TCMR, la nefropatía crónica del injerto fue eliminada, e introducida la de fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA, del inglés *interstitial fibrosis and tubular atrophy*)<sup>33</sup>.

En 2007, las 6 categorías diagnósticas son actualizadas y se definen estadios para la capilaritis peritubular (ptc) y el C4d<sup>34</sup>. En la actualización de 2013, ya se incluye el RMA C4d negativo dentro de la clasificación, además de introducir novedades relativas a las lesiones asociadas a anticuerpos<sup>35,36</sup>. Loupy, Haas, Solez y Racousen, entre otros, se plantearon en 2015 las perspectivas futuras en el sentido de ir implementando el análisis de la expresión génica y el diagnóstico molecular<sup>37</sup>.

Más recientemente, en 2017, se reunieron por última vez los principales expertos de Banff en la ciudad de Barcelona, donde tuve el honor de asistir, para tratar principalmente dos aspectos: las implicaciones clínicas de la inflamación en las áreas de fibrosis intersticial y atrofia tubular y su relación con el TCMR y en segundo lugar, los avances en el diagnóstico molecular del rechazo, con especial atención al AMR<sup>38</sup>.

Para facilitar el diagnóstico histológico de la biopsia renal y facilitar la interpretación de los hallazgos, Banff establece un sistema semicuantitativo basado en 4 estadios de gravedad o intensidad, del 0 al 3, para diferentes aspectos o lesiones que se resumen en la Tabla 1 y que vienen recogidos en la publicación de la reunión de 2015<sup>37</sup> así como en la guía de referencia recién publicada<sup>39</sup>.

<b>i: inflamación</b> i0: sin inflamación o <10% en el parénquima cortical no fibrosado i1: inflamación en 10-25% del parénquima cortical no fibrosado i2: inflamación en 26-50% del parénquima cortical no fibrosado i3: inflamación en >50% del parénquima cortical no fibrosado
<b>t: tubulitis</b> t0: sin presencia de leucocitos en túbulos t1: 1-4 leucocitos por sección transversal tubular t2: 5-10 leucocitos por sección transversal tubular t3: >10 leucocitos por sección transversal tubular o $\geq 2$ áreas con destrucción de la membrana basal glomerular acompañado de i2/i3 y t2 en otro foco
<b>v: arteritis intimal</b> v0: sin arteritis v1: arteritis intimal leve o moderada en al menos una sección transversal arterial v2: arteritis intimal grave con al menos un 25% de pérdida del área luminal v3: arteritis transmural y/o lesiones fibrinoides de arterias y necrosis de la túnica media de músculo liso con infiltrado linfocitario en vasos
<b>g: glomerulitis</b> g0: sin glomerulitis g1: glomerulitis en <25% de los glomérulos g2: glomerulitis segmental o global en 25-75% de los glomérulos g3: glomerulitis en >75% de los glomérulos
<b>ptc: capilaritis peritubular</b> ptc0: >1 leucocito en <10% de los capilares peritubulares de la zona cortical y/o <3 leucocitos ptc1: >1 leucocito en $\geq 10\%$ de los capilares peritubulares de la zona cortical con 3-4 leucocitos en el capilar peritubular más afectado ptc2: >1 leucocito en $\geq 10\%$ de los capilares peritubulares de la zona cortical con 5-10 leucocitos en el capilar peritubular más afectado ptc3: >1 leucocito en $\geq 10\%$ de los capilares peritubulares de la zona cortical con >10 leucocitos en el capilar peritubular más afectado
<b>C4d: depósitos de C4d</b> C4d0: tinción negativa en capilares peritubulares (0%) C4d1: tinción mínima (>0% pero <10% de los capilares peritubulares) C4d2: tinción focal (10-50% de los capilares peritubulares) C4d3: tinción difusa (>50% de los capilares peritubulares)
<b>cg: dobles contornos en la membrana basal glomerular</b> cg0: sin dobles contornos cg1a: sin dobles contornos mediante microscopía de campo claro pero dobles contornos incompletos o circunferenciales en >3 capilares glomerulares mediante microscopía electrónica, asociado a edema endotelial y/o engrosamiento subendotelial cg1b: dobles contornos en 1-25% de los capilares glomerulares en el glomérulo no esclerosado más afectado cg2: dobles contornos en 26-50% de los capilares glomerulares en el glomérulo más afectado cg3: dobles contornos en >50% de los capilares glomerulares en el glomérulo más afectado

<b>mm:</b> aumento de la matriz mesangial mm0: leve aumento de la matriz mesangial en cualquier glomérulo mm1: al menos un moderado aumento de la matriz mesangial en <25% de los glomérulos no esclerosados mm2: al menos un moderado aumento de la matriz mesangial en 26-50% de los glomérulos no esclerosados mm3: al menos un moderado aumento de la matriz mesangial en >50% de los glomérulos no esclerosados
<b>ah:</b> arteriolo-hialinosis ah0: sin engrosamiento hialino arteriolar mediante tinción PAS ah1: leve a moderado engrosamiento hialino mediante tinción PAS en al menos una arteriola ah2: moderado a grave engrosamiento hialino mediante tinción PAS en más de una arteriola ah3: grave engrosamiento hialino mediante tinción PAS en muchas arteriolas
<b>cv:</b> engrosamiento de la íntima fibrosa de la pared vascular cv0: sin cambios vasculares crónicos cv1: estrechamiento vascular en <25% del área luminal por engrosamiento de la íntima cv2: estrechamiento vascular en 26-50% del área luminal por engrosamiento de la íntima cv3: estrechamiento vascular en >50% del área luminal por engrosamiento de la íntima
<b>ci:</b> fibrosis intersticial ci0: fibrosis intersticial en <5% del área cortical ci1: fibrosis intersticial en 6-25% del área cortical (fibrosis intersticial leve) ci2: fibrosis intersticial en 26-50% del área cortical (fibrosis intersticial moderada) ci3: fibrosis intersticial en >50% del área cortical (fibrosis intersticial grave)
<b>ct:</b> atrofia tubular ct0: sin atrofia tubular ct1: atrofia tubular en <25% del área de túbulos corticales (atrofia tubular leve) ct2: atrofia tubular en 26-50% del área de túbulos corticales (atrofia tubular moderada) ct3: atrofia tubular en >50% del área de túbulos corticales (atrofia tubular grave)

**Tabla 1.** Criterios y estadios sobre las lesiones a evaluar para diagnóstico histológico de las biopsias de trasplante renal según la clasificación de Banff. Adaptado de Banff 2015 *Meeting Report, American Journal of Transplantation*, 2017. PAS: tinción de ácido periódico de Schiff, del inglés *Periodic Acid-Schiff*.

Así, se establece la gravedad de la inflamación observada en la muestra de tejido biopsiado (i), la tubulitis (t), la arteritis intimal (v), la glomerulitis (g) que se cataloga según el porcentaje de glomérulos afectados, la capilaritis peritubular (ptc), el depósito de C4d que se evalúa mediante inmunofluorescencia (IF) o inmunohistoquímica (IHQ), especificando cada intensidad. La evaluación de los dobles contornos en la membrana basal glomerular (cg) abarca además una subclasificación en la que el grado 1 incluye un cg1a, si no se identifican dobles contornos en microscopía óptica pero sí se

identifican (incompleto o circunferencial) en al menos tres capilares glomerulares mediante microscopía electrónica, asociado a edema endotelial y/o engrosamiento subendotelial; y un cg1b, si se identifican dobles contornos en 1-25% de los capilares glomerulares del glomérulo más afectado no esclerosado mediante microscopía óptica. También el aumento de la matriz mesangial (mm), la arteriolohipertensión (ah) que puede asociarse a diferentes circunstancias como la nefrotoxicidad inducida por medicamentos, el envejecimiento, la hipertensión o la diabetes, el engrosamiento fibroso de la íntima de la pared vascular (cv), la fibrosis intersticial (ci), la atrofia tubular (ct), que también se representa en porcentaje (FI/AT), así como el porcentaje de glomérulos esclerosados respecto al número total de glomérulos que aparecen en la muestra.

Las categorías diagnósticas de Banff para las biopsias de aloinjertos renales actualizadas en el año 2017 se resumen en la Tabla 2 <sup>38</sup>.

<b>Categoría 1: Biopsia normal sin cambios específicos</b>
<b>Categoría 2: Rechazo mediado por anticuerpos (AMR)</b>
<p><b>AMR Agudo/Activo:</b> debe cumplir los siguientes 3 criterios</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Evidencia histológica de lesión aguda, que incluya una o más de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflamación microvascular (<math>g &gt; 0</math> y/o <math>ptc &gt; 0</math>) en ausencia de glomerulonefritis</li> <li>- Arteritis intimal o transmural (<math>v &gt; 0</math>)</li> <li>- MAT aguda en ausencia de otras causas</li> <li>- Necrosis tubular aguda en ausencia de otras causas</li> </ul> </li> <li>2. Evidencia de interacción actual o reciente de anticuerpos con el endotelio vascular, que incluya una o más de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Depósito de C4d en los capilares peritubulares (C4d2/C4d3 mediante IF o C4d &gt; 0 mediante IHQ)</li> <li>- Presencia de inflamación microvascular (<math>[g + ptc] \geq 2</math>) en ausencia de glomerulonefritis, aunque sea en presencia de RMCT agudo, inflamación borderline o infección; no siendo suficiente sólo <math>ptc \geq 2</math> y siendo <math>g \geq 1</math></li> <li>- Expresión aumentada de transcritos indicativos de RMA</li> </ul> </li> <li>3. Evidencia serológica de la presencia de DSAs (anti-HLA u otros antígenos): se podrá sustituir por tinción de C4d si cumple el criterio 2. Sin embargo, se recomienda analizar la presencia de DSA anti-HLA y no-HLA</li> </ol> <p><b>Sospecha de AMR Agudo/Activo:</b> biopsias que cumplen el punto 1 y el 2 ó el 3, pero no ambos</p>

**AMR Crónico Activo:** debe cumplir los siguientes 3 criterios

1. Evidencia histológica de lesión crónica, que incluya al menos una de las siguientes:
  - GP del trasplante (cg>0) si no hay evidencia de MAT o glomerulonefritis, incluyendo cg1a
  - Presencia de dobles contornos a nivel de la membrana basal glomerular
  - Fibrosis de la íntima arterial como hallazgo que excluya otras causas
2. Evidencia de la interacción actual o reciente de anticuerpos con el endotelio vascular, que incluya una o más de las siguientes:
  - Depósito de C4d en los capilares peritubulares (C4d2/C4d3 mediante IF o C4d>0 mediante IHQ)
  - Presencia de inflamación microvascular ([g+ptc]≥2), aunque sea en presencia de un RMCT agudo, inflamación *borderline* o infección; no siendo suficiente sólo ptc≥2 y siendo g≥1
  - Expresión aumentada de transcritos indicativos de daño endotelial
3. Evidencia serológica de la presencia de DSAs (anti-HLA u otros antígenos): biopsias sospechosas que cumplan los criterios 1 y 2 deben ser analizadas para identificar DSAs.

**Sospecha de AMR Crónico/activo:** biopsias que cumplen el punto 1 y el 2 ó el 3, pero no ambos

**C4d<sup>+</sup> sin evidencia de rechazo:** debe cumplir los siguientes 3 criterios

1. Depósito de C4d en los capilares peritubulares (C4d2/C4d3 mediante IF o C4d>0 mediante IHQ)
2. g=0, ptc=0, cg=0, v=0, sin MAT, sin dobles contornos en la membrana basal de los capilares peritubulares, sin daño tubular agudo
3. Sin RMCT tipo IA o mayor ni cambios *borderline*

**Categoría 3: Cambios Borderline sospechosos de TCMR**

- Focos de tubulitis (t1/t2/t3) con inflamación intersticial mínima (i0/i1), o inflamación intersticial (i2/i3) con tubulitis leve (t1)
- sin arteritis intimal (v=0)

**Categoría 4: Rechazo mediado por células T (TCMR)**

**TCMR Agudo**

IA: inflamación intersticial (>25% del tejido cortical sin fibrosar, i2/i3 con focos de tubulitis moderada (t2)

IB: inflamación intersticial significativa (>25% del tejido cortical sin fibrosar, i2/i3) con focos de tubulitis grave (t3)

IIA: arteritis intimal ligera o moderada (v1) con o sin inflamación intersticial y tubulitis

IIB: arteritis intimal grave afectando a >25% del tejido cortical sin fibrosar (v2) con o sin inflamación intersticial y tubulitis

III: arteritis transmural y/o daño fibrinoide arterial y necrosis de las células musculares de la capa media arterial con inflamación linfocitaria (v3)

**TCMR Crónico/Activo:** arteriopatía crónica del injerto (fibrosis intimal arterial con infiltración de células mononucleares en fibrosis, formación de neoíntima); puede solaparse con un AMR crónico activo, pero el TCMR también lo manifiesta en la zona tubulointersticial



<p><b>Categoría 5: Fibrosis Intersticial y Atrofia Tubular</b></p> <p>I: fibrosis intersticial leve y atrofia tubular (<math>\leq 25\%</math> del área cortical)</p> <p>II: fibrosis intersticial moderada y atrofia tubular (26-50% del área cortical)</p> <p>III: fibrosis intersticial grave y atrofia tubular (<math>&gt; 50\%</math>)</p>
<p><b>Categoría 6: Otros cambios no considerados causa de rechazo agudo o crónico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nefropatía por virus BK</li> <li>- Enfermedades linfoproliferativas post-trasplante</li> <li>- Nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina</li> <li>- Daño tubular agudo</li> <li>- Enfermedades recurrentes</li> <li>- GP <i>de novo</i> (distintas a GP del trasplante)</li> <li>- Pielonefritis</li> <li>- Nefritis intersticial inducida por medicamento</li> </ul>

**Tabla 2.** Criterios diagnósticos y categorías diagnósticas de Banff para trasplante renal. AMR: rechazo mediado por anticuerpos; DSA: anticuerpo donante específico; TCMR: rechazo mediado por células T; IF: inmunofluorescencia; IHQ: inmunohistoquímica; GP: glomerulopatía; MAT: microangiopatía trombótica; DSA: anticuerpos específicos de donante, del inglés *donor specific antibodies*. Adaptado de *Banff 2017 Kidney Meeting Report, American Journal of Transplantation*, 2018.

### Criterios diagnósticos de rechazo en el trasplante hepático

La primera vez que el grupo de expertos de Banff redactó un documento consenso sobre el rechazo en el trasplante hepático fue en 1997, donde Demetris y otros autores acordaron una nomenclatura común y establecieron unos criterios para reconocer el rechazo agudo y minimizar los problemas que generaba la multitud de sistemas presentes en la literatura basándose en la relevancia clínica y la simplicidad y reproducibilidad de los datos <sup>40</sup>. En aquel momento ya se había consensuado un sistema similar para el trasplante renal, cardíaco y pulmonar, y los autores anticipaban que tratarían el rechazo crónico del trasplante hepático en el futuro, además de mostrar su flexibilidad para añadir futuras mejoras y modificaciones.

Para el diagnóstico del rechazo agudo, los autores establecieron que se debían cumplir al menos dos de los tres criterios siguientes: la existencia de un infiltrado inflamatorio portal, inflamación localizada a nivel subendotelial en ramificaciones de la vena portal o vénulas hepáticas terminales, e inflamación o daño en conductos biliares. Además, se estableció una gradación incluyendo los grados indeterminado, intermedio (I), moderado (II) y grave (III) <sup>40</sup>.

En el año 2000 y tras la conferencia de Banff celebrada en 1999, apareció una actualización del esquema tratando el tema del rechazo crónico<sup>21</sup>. Se puso de manifiesto que el RC se relacionaba con daños irreversibles en conductos biliares, en arteria hepática y sus ramificaciones y en vénulas hepáticas que conduce a fibrosis y trombosis. Además, la sospecha de RC se tenía mayoritariamente en pacientes con múltiples episodios de rechazo agudo que progresaban a colestasis, o en pacientes con un episodio de rechazo agudo no resuelto. Por otro lado, se reconocía la existencia de un RC temprano y otro tardío.

A pesar de las propiedades inmunológicas características del hígado, considerado históricamente como un órgano muy tolerogénico, así como su capacidad regenerativa, los autores apuntan al reconocimiento antígeno-dependiente como factor de riesgo principal para el daño tisular, por encima de factores de riesgo no inmunodependientes<sup>21</sup>.

La idea de que el hígado es un órgano poco inmunogénico se fundamenta principalmente en características de su microambiente y anatomía. El suplemento de sangre que recibe este órgano viene a través de su vena porta y arteria hepática procedente del intestino y la circulación periférica. La sangre que circula por la vena portal es una sangre rica en antígenos derivados de los alimentos ingeridos y de productos de la degradación bacteriana. Es por ello que la exposición continua a estas moléculas le proporciona unas características de una especie de tolerancia a endotoxinas y como consecuencia la presentación de antígenos extraños mediado por APCs como células de Kupffer o por células endoteliales sinusoidales y hepatocitos<sup>17</sup>. Por ello, ni siquiera se considera esencial realizar el tipaje HLA en receptor y donante en muchos centros trasplantadores para su selección y mejor adecuación.

No ha sido hasta el año 2016 cuando una nueva actualización de los criterios del grupo de Banff para trasplante hepático, tras las reuniones en Francia en 2011, en Brasil en 2013 y en Canadá en 2015, actualizando sus criterios y publicado una nueva versión donde se establece la denominación de AMR por la antigua denominación de rechazo humoral, TCMR por el antiguo término de rechazo agudo, así como la denominación de rechazo rico en células plasmáticas que trataremos en el siguiente apartado<sup>41</sup>.

Para mejorar el diagnóstico histológico de la biopsia hepática y facilitar la interpretación de los hallazgos, Banff establece un sistema semicuantitativo basado en 3 estadios de

gravedad o intensidad, del 1 al 3, para diferentes aspectos que se resumen en la Tabla 3, salvo para los depósitos de C4d, que establece los mismos estadios de gravedad que en los criterios de riñón, del 0 al 3 <sup>41</sup>.

<p><b>Inflamación portal:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1: inflamación mayoritariamente linfocítica en una minoría de espacios porta o tríadas, sin una expansión notable</li> <li>2: expansión portal de la mayoría o todas las tríadas por infiltración mixta con linfocitos y en ocasiones blastocitos, neutrófilos y eosinófilos (si la presencia eosinofílica es notoria y viene acompañada por edema y una prominente hipertrofia de las células endoteliales de la microvasculatura, se debe considerar un RMA)</li> <li>3: notable expansión portal de la mayoría o todas las tríadas por infiltración mixta que contiene blastocitos y eosinófilos y que invade el parénquima periportal</li> </ol>
<p><b>Daño inflamatorio en conducto biliar:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1: una minoría de conductos infiltrados por células inflamatorias y muestran cambios reactivos leves</li> <li>2: la mayoría o todos los conductos infiltrados por células inflamatorias y alguno presenta daños degenerativos</li> <li>3: como en el estadio 2 y la mayoría o todos los conductos con cambios degenerativos o alteraciones lumbinales focales</li> </ol>
<p><b>Inflamación endotelial venosa</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1: infiltración linfocítica subendotelial que afecta a alguna de las vénulas portales y/o hepáticas</li> <li>2: infiltración subendotelial que afecta a la mayoría o a todas las vénulas portales y/o hepáticas, con o sin necrosis de hepatocitos, en una minoría de regiones perivenulares</li> <li>3: como en los puntos 1 y 2 y con una inflamación perivenular moderada o grave que se extiende al parénquima perivenular y se asocia con necrosis de hepatocitos perivenulares</li> </ol>
<p><b>h: estadio histopatológico</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1: aumento de las células endoteliales de la microvasculatura portal que afecta a la mayoría de tractos portales, con microvasculitis escasa en el capilar más afectado</li> <li>2: microvasculitis o capilaritis con 5-10 leucocitos en el capilar más afectado, con un aumento de las células endoteliales afectando a la mayoría de tractos portales o sinusoides, con variable dilatación de capilares y vénula y edema portal</li> <li>3: como en los puntos 1 y 2 y con marcada dilatación capilar, inflamación microvascular (<math>\geq 10</math> leucocitos en el vaso más afectado), interrupción focal de la microvasculatura, depósito de fibrina y extravasación de glóbulos rojos al estroma portal y/o al espacio de Disse (espacio subsinoidal)</li> </ol>

**C4d:** depósitos de C4d

C4d0: sin depósitos en microvasculatura portal

C4d1: mínimos depósitos (<10% de los tractos portales) en >50% de la circunferencia del endotelio de la microvasculatura portal (vena portal y capilares)

C4d2: depósito focal (10-50% de los tractos portales) en >50% de la circunferencia del endotelio de la microvasculatura portal, normalmente sin extenderse a sinusoides periportales

C4d3: depósitos difusos (>50% de los tractos portales) en >50% de la circunferencia del endotelio de la microvasculatura portal, frecuentemente con extensión a vénulas o sinusoides periportales

**Tabla 3.** Criterios y estadios sobre las lesiones a evaluar para diagnóstico histológico de las biopsias de trasplante hepático según la clasificación de Banff. Adaptado de 2016 *Comprehensive update of the Banff Working Group on liver allograft pathology: introduction of antibody-mediated rejection, American Journal of Transplantation*, 2016.

Las categorías diagnósticas de Banff para las biopsias de aloinjertos hepáticos actualizados en el año 2016 se resumen en la Tabla 4 <sup>41</sup>.

**TCMR Típico:**

Indeterminado: infiltrado inflamatorio portal y/o perivenular relacionado con el aloreconocimiento, pero sin mostrar daño suficiente como para cumplir los criterios de un diagnóstico de rechazo agudo leve

Intermedio: infiltrado característico del rechazo en una minoría de las tríadas, generalmente leve y mayoritariamente localizado en los espacios portales y sin necrosis de hepatocitos

Moderado: infiltrado característico del rechazo, que extiende a la mayoría de los tractos portales y/o perivenulares, con necrosis de hepatocitos

Grave: como en los estadios anteriores y que invade áreas periportales y/o con inflamación perivenular moderada o grave que se extiende hacia el parénquima hepático y se asocia con necrosis de hepatocitos, afectando a la mayoría de las áreas perivenulares

**Rechazo rico en células plasmáticas:** debe cumplir los criterios 1 y 3, siendo el criterio 2 no requerido necesariamente. Se recomienda realizar la tinción para C4d, IgG, IgG4, así como la detección de anticuerpos anti-GSTT1 en receptores nulos/donantes positivos para la GSTT1

1. Presencia de infiltrado portal y/o perivenular rico en células plasmáticas (>30%), con inflamación que invade más allá de la zona portal, y/o actividad necroinflamatoria perivenular, que normalmente afecta a la mayoría de los tractos portales y/o vena central. La mayoría de estos casos se estadian como moderado, ya que presentan una actividad perivenular agresiva, mientras que la inflamación portal es normalmente  $\geq 2$
2. Colangitis linfocítica, cuya presencia es frecuente y deseable, pero no absolutamente requerida (el daño en los conductos biliares es normalmente  $\geq 1$ )
3. Enfermedad de base distinta a hepatitis autoinmune

<p><b>AMR Agudo Activo:</b> debe cumplir los siguientes 4 criterios</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Patrón de daño histopatológico característico de AMR agudo: hipertrofia endotelial de la microvasculatura portal, dilatación de vénula y capilar portal, microvasculitis portal, edema portal y reacción ductular. Normalmente aparece colestasis. En aloinjertos incompatibles en AB0, aparece más frecuentemente edema y necrosis de hepatocitos periportales. Arteritis linfocítica y/o necrotizante.</li> <li>2. DSA positivo en suero</li> <li>3. Depósito de C4d difuso, estadio 3</li> <li>4. Exclusión de otras causas posibles que puedan mostrar patrones de daño similares</li> </ol>
<p><b>Sospecha de AMR:</b> debe cumplir los siguientes 2 criterios</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presencia de DSA</li> <li>2. h diferente de 0 con depósitos de C4d y h3/h4</li> </ol>
<p><b>AMR no determinado:</b> debe cumplir los criterios 1 y 2 y además el 3 ó el 4</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estadio C4d y h<math>\geq</math>2</li> <li>2. Sin presencia de DSA o resultado no fiable o no disponible</li> <li>3. Tinción para C4d negativa o resultado no fiable o no disponible</li> <li>4. Otras causas que simultáneamente puedan estar contribuyendo al daño</li> </ol>
<p><b>AMR Crónico Activo:</b> debe cumplir los siguientes 4 criterios</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Patrón histopatológico de daño relacionado con AMR, que cumpla lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflamación portal y/o perivenular leve, sin otra explicación aparente, con interfase y/o actividad necroinflamatoria perivenular</li> <li>- Fibrosis portal/periportal, sinusoidal y/o perivenular al menos moderada</li> </ul> </li> <li>2. Presencia de DSA anti-HLA circulante en sueros recientes</li> <li>3. Depósitos de C4d al menos focales (&gt;10% del endotelio microvascular del tracto portal)</li> <li>4. Exclusión razonable de otros daños que puedan causar patrones similares</li> </ol>

**Tabla 4.** Criterios diagnósticos y categorías diagnósticas de Banff para trasplante hepático. TCMR: rechazo mediado por células T; IgG: inmunoglobulina G; GSTT1: glutatión S-transferasa T1; AMR: rechazo mediado por anticuerpos; DSA: anticuerpo donante específico. Adaptado de *2016 Comprehensive update of the Banff Working Group on liver allograft pathology: introduction of antibody-mediated rejection, American Journal of Transplantation*, 2016.

### La hepatitis inmune *de novo* o rechazo rico en células plasmáticas

La HIdn fue descrita en 1998 como una forma de disfunción del injerto en niños sometidos a trasplante hepático <sup>42</sup> y posteriormente otros grupos han descrito diferentes series de pacientes con las mismas características clínicas e histológicas <sup>43-45</sup>.

Los criterios diagnósticos de Banff con anterioridad a 2016, reconocían la dificultad de distinguir conceptual e histológicamente lo que sería una hepatitis autoinmune recurrente de un evento *de novo*. Los criterios diagnóstico mínimos incluían infiltrados linfocitarios en las regiones portales, la presencia significativa de anticuerpos,

hipergammaglobulinemia y la exclusión diagnóstica de otros tipos de hepatitis. Algunos de los hallazgos histológicos característicos son la formación rosetoide de los hepatocitos, la inflamación linfoplasmocitoide en las zonas portales, la colangitis linfocítica, entre otros <sup>46</sup>.

Nuestro grupo ya había contribuido con grandes descubrimientos que fueron también recogidos por Banff, en donde la situación de incompatibilidad en GSTT1 descrita en el apartado “Sistemas menores de histocompatibilidad y GSTT1” de esta tesis, podía ser la causante del desarrollo de esta enfermedad <sup>10</sup>.

La nomenclatura referida para identificar esta entidad, ha seguido diferentes corrientes desde “hepatitis autoinmune *de novo*” <sup>42,47,48</sup>, “hepatitis inmune post-trasplante” <sup>49</sup>, “disfunción del injerto que imita a la hepatitis autoinmune” <sup>50</sup>, “hepatitis inmune de novo” <sup>45</sup>, hasta “hepatitis de células plasmáticas” <sup>30,51</sup>. En la última actualización de los criterios de Banff que hemos explicado en el apartado anterior se reconoce esta entidad como un tipo de rechazo y se recomienda utilizar el término “rechazo rico en células plasmáticas (*PC-rich rejection*)” <sup>41</sup>.

### **El tratamiento inmunosupresor**

La inmunosupresión constituye una pieza esencial en el tratamiento de los pacientes trasplantados cuyo objetivo fundamental es evitar el rechazo intentando minimizar los efectos secundarios tales como la predisposición a infecciones, cáncer, hipertensión, dislipemia, etc.

Durante la década de los 60, Schwartz y colaboradores comprobaron que la 6-mercaptopurina tenía propiedades inmunosupresoras <sup>52</sup>, sustancia a partir de la cual se desarrolló la Azatioprina, extensamente usada en aquellos años tanto en el trasplante renal como hepático. La Azatioprina es un antimetabolito que bloquea la síntesis de purinas mediante inhibición competitiva. En esta misma época, se empleó en combinación con corticoides simultáneamente y, aunque se conseguía una relativa supervivencia de los injertos, los rechazos no controlados y las infecciones eran más que notables.

La introducción de la Ciclosporina A en 1976 como inmunosupresor de la respuesta tanto humoral como celular, por su actividad inhibidora de la calcineurina <sup>52</sup>, cambió

radicalmente el panorama del trasplante renal y hepático. Más adelante, durante los 80 y 90, aparecieron el Tacrolimus como nuevo inhibidor de la calcineurina <sup>53</sup> y el Mofetil Micofenolato, que como inhibidor de la síntesis de las purinas, funciona como agente antiproliferativo <sup>54</sup>. Con el cambio de siglo, se identificaron dianas de los inhibidores de la rapamicina (mTOR) como Sirolimus y su derivado Everolimus, que inhiben la transducción de señales del factor de crecimiento de las células T.

Respecto al uso de monoclonales cabe destacar el Basiliximab y el Daclizumab, anticuerpos anti-CD25 quimérico y humanizado, respectivamente, que bloquean señales coestimuladoras en los linfocitos T. Así como el Rituximab, anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20, que elimina células B. Fue en 1984 cuando se le concedió el Nobel a Köhler y Milstein por hallar la forma que permite la producción indefinida de anticuerpos funcionalmente homogéneos, es decir, clonales <sup>55</sup>, lo que abrió la posibilidad de aplicarlos a la clínica humana.

Los fármacos de que disponemos actualmente son cada vez más potentes y selectivos. Los protocolos de inmunosupresión actuales permiten establecer unas pautas terapéuticas adaptadas a cada paciente en función de sus características clínicas, su evolución o la presencia de complicaciones, no existiendo un protocolo determinado genérico de inmunosupresión. De hecho, podemos afirmar que una parte muy importante del éxito del trasplante consiste en realizar una adecuada modulación de la inmunosupresión, de manera que se mantenga el difícil equilibrio entre correcta inmunosupresión que impida un rechazo, un suficiente sistema inmune que responda ante infecciones y aparición de células tumorales, y una suficientemente baja toxicidad medicamentosa para el paciente.

## **La biopsia**

La biopsia es la herramienta imprescindible para la monitorización del injerto renal y hepático. Hoy en día se trata de la técnica *goldstandard* con la que establecer un correcto diagnóstico para poder suministrarla al paciente el tratamiento inmunosupresor más adecuado. La técnica se basa en la punción normalmente mediante aguja fina o gruesa del tejido que se pretende monitorizar, para tomar generalmente más de una muestra, que posteriormente será fijada e incluida en un bloque de parafina.

Constantemente se realizan revisiones sobre las evidencias científicas descritas por la comunidad científica en las reuniones de los grupos de trabajos Banff ya mencionados, que permiten ir actualizando las clasificaciones, buscando siempre la mejor supervivencia de los injertos y la mejora de la calidad de vida de los pacientes. Las nuevas metodologías de estudio molecular y los nuevos marcadores o técnicas histológicas disponibles han aumentado la capacidad diagnóstica y pronóstica de la biopsia. Además, la biopsia debe interpretarse conociendo las características del trasplante, su causa, el tratamiento que está recibiendo el paciente en ese momento y la clínica que está presentando.

Las manifestaciones clínicas que se hacen patentes cuando está ocurriendo un rechazo suelen tener un carácter inespecífico, por lo que el estudio histológico juega un papel principal en el manejo de estas situaciones. Se trata de poder observar *in situ* lo que está ocurriendo en el tejido injertado de manera microscópica, que es el lugar donde tiene lugar desde el inicio hasta la resolución del evento de rechazo, sea cual sea su naturaleza.

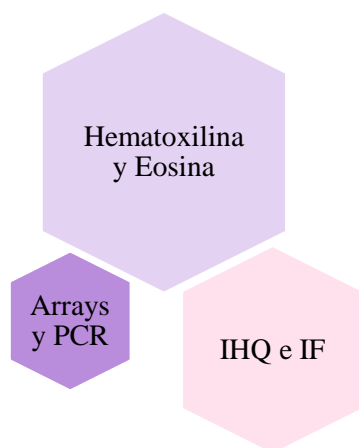
Como hemos comentado con anterioridad, en algunos centros se realizan biopsias de manera protocolizada, lo que permite identificar de forma temprana el inicio de episodios de rechazo que aún no han mostrado manifestaciones clínicas <sup>56</sup>. Mientras que en la mayoría de los centros trasplantadores, la biopsia se realiza únicamente bajo manifestación clínica de disfunción del injerto, como es el caso de las muestras empleadas en el proyecto de investigación de esta tesis doctoral, procedentes del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Resulta de especial relevancia el diagnóstico precoz de las crisis de rechazo al objeto de implantar una terapia de choque con la que se consiga neutralizar la respuesta inmunitaria responsable de estos episodios.

La monitorización histológica del trasplante basada en la biopsia se puede abordar de tres formas principales: el fenotipo histológico analizado mediante tinciones convencionales y basados en Banff, el fenotipo celular basado en técnicas inmunohistoquímicas y de fluorescencia que gracias a anticuerpos mono y policlonales permiten identificar los tipos celulares presentes en el tejido biopsiado, y el fenotipo molecular basado en el estudio de transcritos de expresión mediante técnicas



moleculares (Figura 12). La aproximación de esta tesis doctoral abarca los dos primeros puntos.



**Figura 12.** Monitorización histológica del trasplante, donde se representan los tres abordajes principales empleados.

Las manifestaciones que se hacen patentes en el aloinjerto reflejan un conjunto de eventos que se relacionan específicamente con un fenómeno inmunológico o respuesta inmune concreta y que en segunda instancia se acompañan de un deterioro de la función del órgano trasplantado. Muchas de estas manifestaciones están ampliamente estudiadas y descritas en la bibliografía como hemos venido desarrollando a lo largo de esta introducción, sin embargo, otros puntos necesitan más investigaciones.

### **El análisis de la composición de los infiltrados celulares de la biopsia**

Como hemos visto, la presencia de infiltrados inflamatorios en diferentes áreas anatómicas de los órganos trasplantados forma parte de los hallazgos que ayudan a clasificar el evento de rechazo que pueda estar ocurriendo.

Son pocos los estudios que han abordado la caracterización de las células que componen el infiltrado inflamatorio. Magil y colaboradores identificaron linfocitos T y macrófagos infiltrando glomérulos en una cohorte de 42 trasplantes renales, donde encontraron una asociación entre el rechazo agudo, glomerulitis y la infiltración glomerular de linfocitos T en biopsias sin depósito de C4d, así como la infiltración de monocitos en biopsias C4d<sup>+</sup> <sup>57</sup>. En otro trabajo del mismo grupo, los autores correlacionaron la abundante

presencia de monocitos en biopsias C4d<sup>+</sup> con una peor función renal al año del trasplante <sup>58</sup>. Fahim y colaboradores cuantificaron linfocitos T y monocitos en el compartimento intracapilar de 42 biopsias bajo distintos tipos de rechazo, pero no analizaron la zona intersticial. Sus resultados también apuntan a una mayor presencia de monocitos en biopsias C4d<sup>+</sup> y resaltan que el número de células que se identifican en estos capilares peritubulares es mayor que el estimado mediante histología convencional. La metodología para la cuantificación empleada es la de analizar varios campos de manera en cierto modo subjetiva bajo un objetivo de gran aumento, conocido en inglés como *high power field* (HPF) <sup>59</sup>.

Desde otro tipo de aproximación más molecular, diferentes estudios han analizado mediante *arrays* de expresión muestras de tejido biopsiado y han identificado ciertas relaciones entre algunos tipos de rechazo y tipos celulares como linfocitos B <sup>29</sup>.



## Hipótesis y Objetivos

## **Hipótesis**

En la mayoría de ocasiones, el seguimiento del trasplante conlleva la realización de una biopsia. La presencia de infiltrados intersticiales, infiltrados de células mononucleares, zonas de inflamación, etc., son algunos de los hallazgos histológicos genéricos que se incluyen entre los criterios para la clasificación del rechazo del aloinjerto en el trasplante de órganos sólidos, por lo que su análisis morfológico e histológico generalmente no profundiza en qué tipos celulares están infiltrando el tejido. La identificación de los tipos celulares que infiltran el tejido trasplantado es de crucial importancia para dilucidar mecanismos patogénicos que subyacen a una respuesta de rechazo y puede tener un valor pronóstico respecto a la supervivencia y buena función del injerto. Sin embargo es un tema todavía por estudiar en profundidad. Es por ello que nuestro grupo ha desarrollado una metodología basada en la microscopía avanzada y computarizada que responde a la necesidad de profundización en esta materia y que pasa necesariamente por la búsqueda de nuevas herramientas.

Nuestra hipótesis de partida propone que un estudio detallado, tanto de la composición como de la densidad de células presentes en dichos infiltrados inflamatorios, puede permitir caracterizar de manera más objetiva distintas situaciones de rechazo y llegar incluso a definir un perfil celular sugestivo de la situación en la que se encuentra el aloinjerto.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Por todo ello, el objetivo general de este proyecto es definir la composición del infiltrado inflamatorio en aloinjertos bajo diferentes tipos de rechazo en el trasplante de órganos sólidos, en concreto del trasplante renal y hepático, así como en un caso particular de trasplante de progenitores hematopoyéticos, para un mejor diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

## Objetivos específicos

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

1. Analizar los infiltrados inflamatorios en diferentes categorías de rechazo definidas por los criterios de Banff en biopsias de trasplante renal. **Publicación 1.**
2. Identificar los componentes celulares involucrados en el desarrollo de la hepatitis inmune *de novo* en el trasplante hepático en el contexto de incompatibilidad en GSTT1. **Publicaciones 2 y 3.**
3. Estudiar un caso clínico de desarrollo de hepatitis inmune *de novo* bajo la incompatibilidad en GSTT1 tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos. **Publicación 4.**



Publicaciones



### **Publicación 1**

1. *“Cellular profiles of Banff kidney allograft rejection types through computer-assisted analysis of the inflammatory infiltrates”*

Autores: Elena Aguado Domínguez, Rocío Cabrera Pérez, Alejandro Suarez Benjumea, Cristina Abad Molina, Antonio Núñez Roldán e Isabel Aguilera.

Manuscrito en preparación para *Kidney International*.

**En este ejemplar de la tesis depositada en formato digital son omitidas las páginas 54 a 67, correspondientes al contenido de la “Publicación 1”, por ser un manuscrito en preparación aún no publicado.**

## **Publicación 2**

2. *“Identification of the cellular components involved in de novo immune hepatitis: a quantitative immunohistochemical analysis”*

Autores: Elena Aguado Domínguez, Lourdes Gómez, José Manuel Sousa, Miguel Ángel Gómez Bravo, Antonio Núñez Roldán e Isabel Aguilera.

*Journal of Translational Medicine* 2018; 16(1):62

RESEARCH

Open Access



# Identification of the cellular components involved in de novo immune hepatitis: a quantitative immunohistochemical analysis

Elena Aguado-Domínguez<sup>1</sup>, Lourdes Gómez<sup>2</sup>, José Manuel Sousa<sup>3</sup>, Miguel Ángel Gómez-Bravo<sup>4</sup>, Antonio Núñez-Roldán<sup>1</sup> and Isabel Aguilera<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Background:** Diagnosis of de novo immune hepatitis (dnIH) after liver transplantation relies on biopsy findings, with an abundance of plasma cells (PCs) in the inflammatory infiltrates a hallmark of the disease. Very little is known about what other types of immune cells exist in the infiltrates mainly located in the portal areas of the liver tissue.

**Methods:** We analyzed the composition of T cells, B cells, PCs, and macrophages in the liver biopsies of 12 patients with dnIH, 9 of them obtained at the time of diagnosis. For comparison, biopsies from 9 patients with chronic rejection (CR) were included in the study. The results were analyzed by a computer-assisted stereology quantification method.

**Results:** The major components of the infiltrates in the portal areas were CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in both groups, with 36.6% in the dnIH group versus 49.4% in the CR group. CD20<sup>+</sup> B lymphocytes represented 14.9% in the dnIH group and 29.1% in the CR group. Macrophage levels were very similar in the dnIH and CR group (19.7% versus 16.8%, respectively). PCs were much less represented in CR biopsies than those from the dnIH group (mean value of 4.7% versus 28.8%).

**Conclusion:** In conclusion, the determination of a characteristic cellular profile could be an important tool for a more reliable diagnosis of dnIH, in support of the histological evaluation made by the pathologist, which in most cases is challenging. Recognition of this condition is crucial because it leads to graft failure if left untreated.

**Keywords:** Inflammatory infiltrates, Liver biopsy, De novo immune hepatitis, newCAST, Chronic rejection, Donor/recipient mismatch, GSTT1

## Background

De novo immune hepatitis (dnIH) is a dysfunction of the liver allograft that resembles native liver autoimmune hepatitis (AIH). Over the years, the nature of this response has been debated, although more recently, several reports sustained that de novo AIH was a variant of rejection and not a true autoimmune process [1–3]. In the group of patients diagnosed with dnIH in our

hospital, we described the enzyme glutathione S-transferase T1 (GSTT1) as the target antigen of the immune response when a patient homozygous for the deletion allele (*GSTT1*\*0/0), receives a liver from a donor with one or two functional copies of the gene (*GSTT1*\*A/0, *GSTT1*\*A/A) [4]. As a result, this drug metabolizing enzyme, highly active in the liver and expressed only in the graft, is recognized as a foreign antigen. In our experience, the rejection occurs within 2 years of the liver transplant, is always preceded by production of anti-GSTT1 antibodies, and is associated with receiving cyclosporine as the main initial immunosuppressor. In contrast, the use of tacrolimus as a calcineurin inhibitor has a protective effect preventing anti-GSTT1 antibody

\*Correspondence: iaguilera-ibis@us.es

<sup>1</sup> Department of Immunology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

production and subsequently the development of dnIH [5]. The main subclasses of anti-GSTT1 antibodies have been characterized as IgG1 and IgG4 at similar proportions [6].

Distinguishing dnIH by liver biopsy is challenging because it shares some histological and clinical features with late onset acute rejection or with other post-transplant pathologies such as recurrent hepatitis C virus [7]. Apart from the presence of plasma cell (PC)-rich infiltrates in portal tracts, histological features may include portal bridging fibrosis, interface hepatitis, centrilobular hepatocyte necrosis or rosette formation. As biopsy findings are variable and not specific, diagnosis of dnIH cannot be made or excluded by histology alone. In the last update of the Banff Working Group on liver allograft pathology, the experts agreed on the need to replace the old terminology with the more appropriate "plasma cell-rich rejection", in which antibodies to GSTT1 and HLA donor-specific antibodies are contributory but nonessential features [8].

In this study, we quantified the main cellular types of inflammatory infiltrates in the portal tracts of diagnostic biopsies of patients with dnIH. A group of liver transplanted patients with chronic rejection (CR) was also studied. To date, very few studies have investigated the composition of the cellular infiltrates and the relative contribution of the cell types involved in dnIH aside from the recognition of a PC population. An accurate, unbiased, and reproducible tool has been designed by our group in order to reduce intra- and inter-observer variability as well as to provide a precise cell representation in the tissue.

The aim of this study was to identify the cell types relevant for the immune response after liver transplantation from diagnostic biopsies of patients with dnIH, and to establish a common cellular profile (if there is one) using a novel protocol based on computer-assisted stereology quantification.

## Methods

### Patients

A cohort of 12 liver transplanted patients with a diagnosis of dnIH was included in the study. Liver transplantations were performed between 1996 and 2007 at Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain. Biopsies were harvested under clinical indication, from 1997 to 2012. No biopsy was collected solely for the purpose of this study. Two transplant recipients (patients 3 and 4) had a second follow-up biopsy collected months after diagnosis, and one patient (patient 7) had a biopsy obtained 4 months prior to diagnosis. A total of 15 specimens were analyzed. All cases were clinically and histologically reviewed in order to confirm dnIH diagnosis

by physicians and pathologists. Eleven of the 12 patients received cyclosporine as baseline immunosuppression versus one patient who received tacrolimus. Nine additional biopsies from 9 patients who experienced CR were also included as a control group, where 7 of them had tacrolimus-based immunosuppression (Table 1).

All specimens were anonymized and were handled according to the ethical guidelines of the current Declaration of Helsinki, with the approval of the Hospital Universitario Virgen del Rocío ethical committee.

### Cell markers

Mouse monoclonal anti-human CD20 (clone L26), rabbit polyclonal anti-human CD3, and mouse monoclonal anti-human CD68 (clone PG-M1) were ready to use, and mouse monoclonal anti-human CD138 (clone MI15) was used at 1:80 dilution, all of them from Dako (Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States of America); mouse monoclonal anti-human IgG4 (HP6025, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, United States of America) was used at 1:500 dilution.

### Immunohistochemistry

Three-micrometer-thick serial sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were dewaxed in xylene, rehydrated in a series of ethanol, and heat-treated in citrate buffer (Dako, target retrieval solution, ref. S2031) for antigenic unmasking for 20 min. Sections were blocked for 40 min using blocking reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in maleic acid. Primary antibodies were incubated for 60 min at room temperature using a humid chamber. EnVision™ mixed secondary antibody (Dako, ref. K8000) was incubated for 40 min at room temperature using a humid chamber after several washes in PBS. The immunoreaction was completed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Tissue sections were counterstained with hematoxylin. The same protocol was followed but omitting the primary antibody as negative control.

### Areas of inflammation

Immunostained slides were examined by a pathologist, blinded to diagnosis details. An exhaustive stereology evaluation was also performed, avoiding observer subjectivity, using new Computer-Assisted System Technology (newCAST™) by Visiopharm® (Visiopharm, Hoersholm, Denmark) equipped with an Olympus BX61 (Olympus, Volketswil, Switzerland).

The area of portal inflammation was measured and cells were quantified as described below. GraphPad Prism® Software (La Jolla, California, United States of America) was used for results representation, presented as mean and standard deviation for continuous variables



**Table 1** Characteristics of the patients with de novo immune hepatitis and chronic rejection

Patient	Gender	Original disease	Baseline IS	Biopsy date (biopsy #)	Months after LT	Diagnosis
1	F	Drug toxicity	CYA, AZA, ST	18-02-00 <sup>a</sup>	21	dnlH
2	M	Alcoholic cirrhosis	CYA(N), MMF, ST	15-03-04 <sup>a</sup>	58	dnlH
3	M	HCV + alcoholic cirrhosis	CYA(N), ST, anti-CD25	13-07-04 (B1) <sup>a</sup> 05-09-04 (B2)	32 34	dnlH
4	F	Alcoholic cirrhosis	CYA, MMF, ST	16-07-04 (B1) <sup>a</sup> 13-06-05 (B2)	10 21	dnlH
5	F	Unknown	CYA, MMF, ST	28-01-10 <sup>a</sup>	32	dnlH
6	F	PBC	CYA, MMF, ST	19-04-10 <sup>a</sup>	13	dnlH
7	F	HCV cirrhosis	CYA, MMF, ST	30-07-12 (B1) 05-12-12 (B2) <sup>a</sup>	3 8	HCV + AR dnlH
8	M	HCV cirrhosis	TAC, ST	28-12-00 <sup>a</sup>	14	dnlH
9	F	HCV cirrhosis	CYA, MMF, ST	18-06-09 <sup>a</sup>	57	dnlH
10	F	SBC	CYA (N), MMF, ST	19-02-14 <sup>a</sup>	87	dnlH
11	F	HCV cirrhosis	CYA, AZA, ST	25-04-97 <sup>a</sup>	7	dnlH
12	F	HCV cirrhosis	CYA(N), ST, anti-CD25	04-02-02 <sup>a</sup>	19	dnlH
CR-1	F	HCV cirrhosis	TAC, MMF, ST	09-11-04	29	CR
CR-2	F	PBC	Sotrastaurin	01-11-11	12	Early CR
CR-3	M	Caroli disease	TAC, MMF, ST	08-03-13	17	CR
CR-4	M	Alcoholic cirrhosis + NASH	TAC, MMF, ST, anti-CD25	30-07-13	6	Early CR
CR-5	M	HCV cirrhosis + HC	CYA, MMF, ST	07-06-13	11	CR
CR-6	M	Cryptogenic	TAC, MMF, ST	08-03-12	9	Early CR
CR-7	M	Re-transplant	TAC, MMF, ST	05-08-10	74	CR
CR-8	M	Alcoholic cirrhosis	TAC, anti-CD25	12-03-14	84	CR
CR-9	M	PBC	TAC, anti-CD25	22-01-07	75	CR

M, male; F, female; LT, liver transplant; HCV, hepatitis C virus; PBC, primary biliary cirrhosis; SBC, secondary biliary cirrhosis; IS, immunosuppression; TAC, tacrolimus; AR, acute rejection; CYA, cyclosporine; N, Neoral; MMF, mofetil mycophenolate; ST, steroids; AZA, azathioprine; dnlH, de novo immune hepatitis; CR, chronic rejection; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; HC, hepatocellular carcinoma

<sup>a</sup> dnlH diagnostic biopsy

and percentages. The results were considered statistically significant when  $p$  values were  $< 0.05$ .

#### Cell quantification

Every tissue section corresponding to one cell marker was analyzed using the meander sample tool of the new-CAST<sup>TM</sup> stereology system.

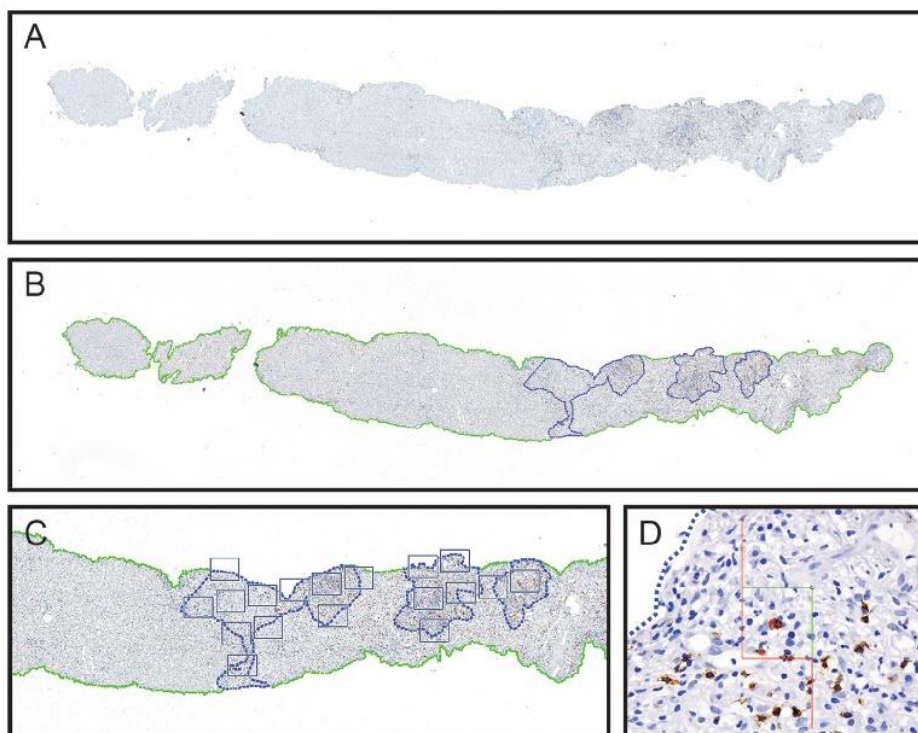
Initially, a super image of the whole slide was captured (Fig. 1A). Then, the tissue was automatically detected by the image software (green line). After that, the portal areas were manually outlined (blue dotted lines) and identified as the region of interest (ROI) (Fig. 1B, C). The computer assisted software, selected areas within these regions by systematic, random sampling (grey squares) (Fig. 1C). Following Visiopharm<sup>®</sup> protocol and using the meander sample tool, cells in portal areas were counted. A counting frame of 30% within one field of view at 400 magnification (Fig. 1D) is accepted as an optimal percentage to achieve a statistically sufficient precision in the cell quantification (<http://www.visiopharm.com>). Higher sampling percentages are time-consuming and

the same accuracy is achieved. All data were automatically recorded by the software and the results are shown in cells per mm<sup>2</sup>.

#### Results

##### Identification of cellular types found in the inflammatory infiltrates in biopsies from patients with dnlH

We analyzed the presence of CD138<sup>+</sup> PCs mainly in portal areas, a characteristic feature of patients with dnlH (Fig. 2), and also screened for T cells, B cells, and macrophages in tissue samples obtained sequentially (Additional file 1: Figure S1). The tissue distribution of T lymphocytes was diffuse; T cells were mainly concentrated in the portal areas but also infiltrated a large number of sinusoidal capillaries (Additional file 2: Figure S2). B cells were significantly present in the infiltrates although to a lesser degree (Additional file 3: Figure S3). The macrophages also had a diffuse pattern, extended over most of the sinusoidal capillaries but also in the portal areas and around the central vein (Additional file 4: Figure S4). We also studied IgG4<sup>+</sup> PCs, which were found



**Fig. 1** Representative images showing quantification procedure using NewCAST™ Visiopharm® software. Super image capture of a tissue slide (A); computer-assisted drawing of the whole tissue (green line) and manually drawn portal areas as regions of interest (ROI) in blue (B); selected areas within the ROIs by random sampling (grey squares) (C); counting frame within one field of view at 400 magnification (D)

in significant numbers in biopsies from patients with dnIH (Additional file 5: Figure S5). It was not possible to study all cellular markers in all the biopsies due to lack of availability of tissue samples. In total, we analyzed 12 diagnostic biopsies, 2 follow-up biopsies, and a prior-to-diagnosis biopsy informed as recurrence of the original virus C hepatitis.

#### Cellular profile of the inflammatory infiltrates in the portal areas in patients with dnIH

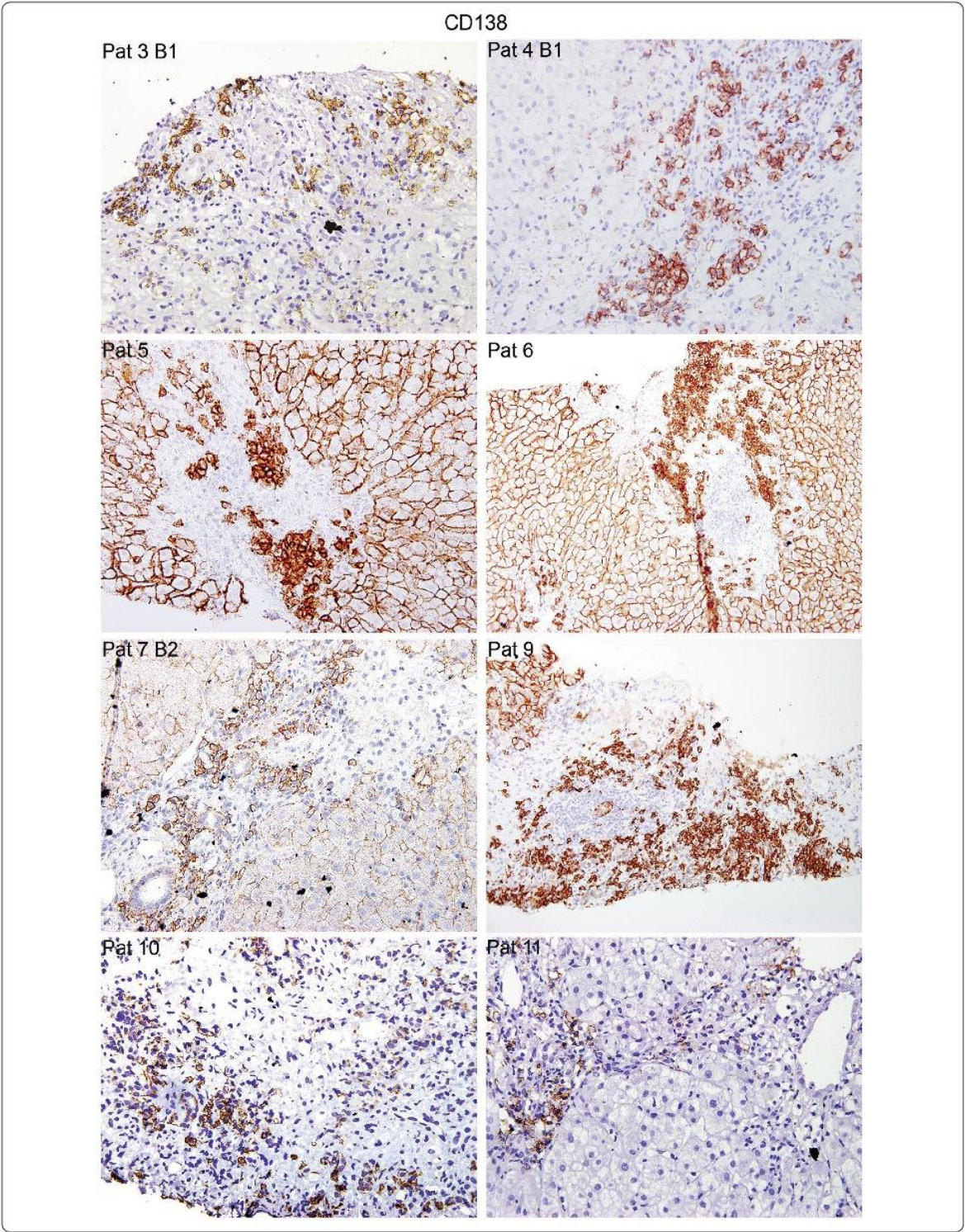
In an attempt to define a cellular profile associated with this form of post-transplant pathology, we quantified the number of cells per mm<sup>2</sup> of tissue (Table 2). We evaluated the relative presence of each cell type at the time of diagnosis in 9 biopsies for the 5 markers: CD138<sup>+</sup> and IgG4<sup>+</sup>

(PCs), CD20<sup>+</sup> (B cells), CD3<sup>+</sup> (T cells), and CD68<sup>+</sup> (macrophages) (Fig. 3). Considering that the biopsies were performed at very different post-transplant periods that ranged from 7 months to 7 years (see Table 1), the profiles were fairly similar. In general, there is an important contribution of CD138<sup>+</sup> PCs (IgG4<sup>−</sup> + IgG4<sup>+</sup>) with percentages that range from approximately 20% (patients 1, 3, 5 and 11) to 30% (patient 12) and even higher, between 34 and 38% (patients 6, 7, 9 and 10). IgG4<sup>+</sup> PCs values are more variable, ranging from 19.8% of the total infiltrate in patient 12 to almost nothing (patients 1 and 5). PCs (IgG4<sup>+</sup> + IgG4<sup>−</sup>) accounted for more than 20% of the entire infiltrate confirming the main feature of this type of rejection. The amounts of CD3<sup>+</sup> T cells were variable, ranging from 21.7% (patient 7) to 49.5% (patient 9). The

(See figure on next page.)

**Fig. 2** Representative images of dnIH diagnostic biopsies immunostained for CD138<sup>+</sup> PCs, which are mainly found in the portal areas. Note that, in some biopsies, CD138 also stains the cellular membrane of hepatocytes. Biopsies from patients (Pat) 3, 4, 5, 7, 10 and 12 are shown at ×400 and Pat 6 and 9 at ×200 magnification







**Table 2** Inflammatory cell count in biopsies of 12 patients with de novo immune hepatitis

Patient	CD138 <sup>+</sup> IgG4 <sup>-</sup>	CD138 <sup>+</sup> IgG4 <sup>+</sup>	CD138 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>	Total
Diagnostic biopsies							
1	–	–	600	333.3	1381.8	635.3	2950.4
2	–	–	–	375.7	1808.7	–	–
3 B1	808.4	52.2	860.6	668.4	1860.9	852.3	4241.6
4 B1	–	–	1439.2	–	–	–	–
5	1595	40	1635	1157	2019.6	2507.3	7318.9
6	1553.5	797.9	2351.4	325.2	2116.6	1381.5	6174.7
7 B2	935.9	160	1095.9	837.5	641.2	374	2948.6
8	–	–	–	244.1	2051.2	–	–
9	1658.9	88.3	1747.3	613.5	2422.7	114.9	4898.9
10	899	81.3	980.3	524.5	645.2	721.2	2871.3
11	599.8	89.5	689.4	735.6	1636.6	344.3	3405.9
12	286.7	533.3	820	400	1008.7	466.7	2695.3
Follow-up biopsies							
3 B2	105.7	9.5	115.2	109.9	1296.1	630.8	215.2
4 B2	344.5	71.8	416.3	1591.2	3226.7	530	5764.2
Recurrent HCV prior to the development of dnIH							
7 B1	227.1	154.2	381.3	295.8	838.1	779.6	2294.8

Cell number is shown as cells/mm<sup>2</sup>

PC, plasma cell; B1, biopsy 1; B2, biopsy 2

proportions of CD68<sup>+</sup> macrophages were more similar, with 5 patients in the range of 20%, although there were some differences, with levels as high as 34.3% (patient 5) and as low as 2.3% (patient 9). The B cells were in general lower than PCs except for patient 11, who had a similar proportion of B cells and PCs. Although we could not study CD4 or CD8 markers in all the biopsies, we obtained the numbers in two samples and the proportion within the CD3<sup>+</sup> population was 35.5% CD4<sup>+</sup> versus 64.5% CD8<sup>+</sup> cells for patient 5 and 19% CD4<sup>+</sup> versus 81% CD8<sup>+</sup> cells for patient 6.

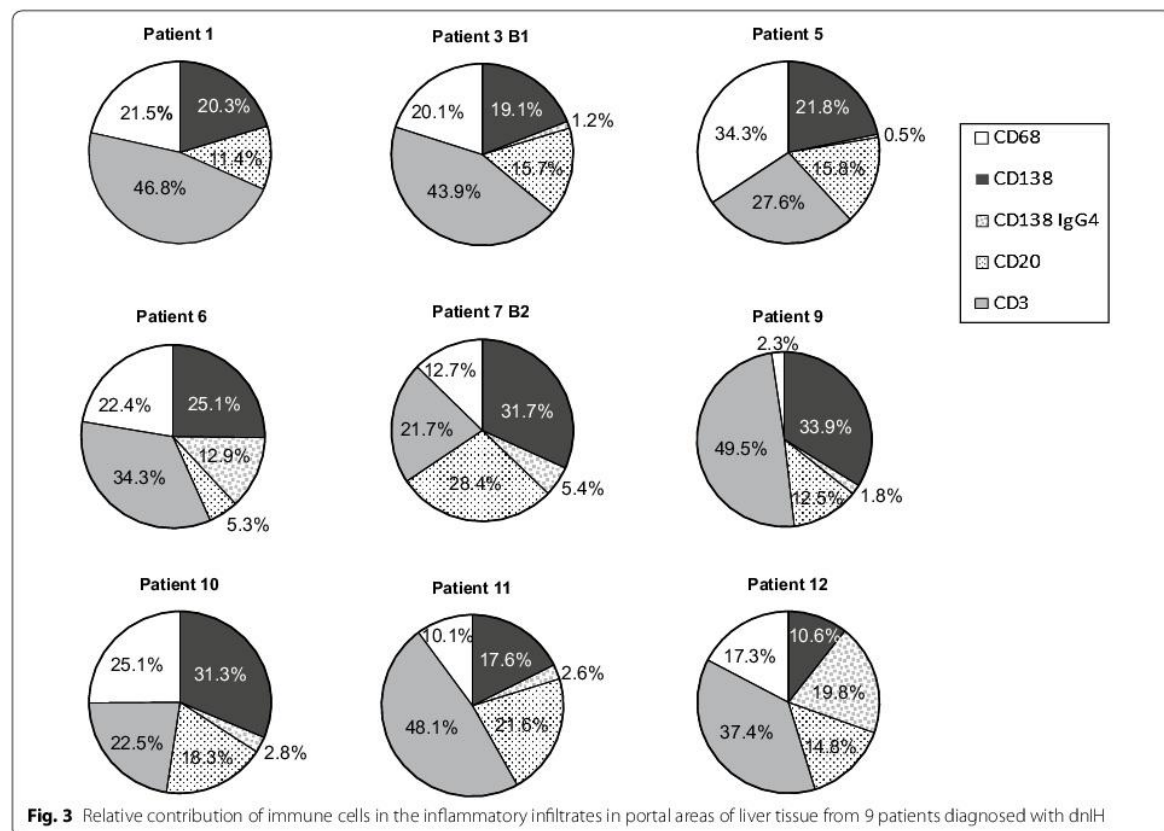
#### Cellular composition of the inflammatory infiltrates in biopsies from patients with chronic rejection

We analyzed the same markers, except IgG4 due to the lack of tissue samples, in diagnostic biopsies obtained from a group of 9 patients with CR. The number of cells/mm<sup>2</sup> tissue obtained after immunohistochemistry experiments is shown in Table 3. The results revealed that CD138<sup>+</sup> PCs were practically absent in 3 of the 9 patients studied (CR-5, 8 and 9), present at a very low proportion in 3 patients (CR-3, 4 and 7) (2.7–4.8%), and present at higher values in the 3 remaining patients (CR-1, 2 and 6) (7.6–14.3%), but never reaching levels seen in the dnIH diagnostic biopsies. T lymphocytes were the most represented cell type in 7 of the 9 biopsies, with percentages higher than 50% in 6 patients and between 19.2 and

39.7% in the other 3 patients. The infiltrates also contained abundant B cells and macrophages (Fig. 4).

#### dnIH versus CR profiles

By comparison of the cellular composition of biopsies from patients with dnIH versus CR, we propose a profile model for diagnosis of dnIH in liver tissue. The most distinctive feature of dnIH is the proportion of PCs, with a mean value of 28.8% that includes IgG4<sup>+</sup> (4.9%) and IgG4<sup>-</sup> (23.9%) compared with a mean value of 4.7% for the CR group. T cells predominate in the cellular infiltrates in both groups, with a mean of 36.6% in the dnIH group versus 49.4% in the CR group. Interestingly, B cells in CR biopsies were twofold the number in dnIH biopsies (29.1% versus 14.9%, respectively). The innate immune response represented by macrophages is very similar in both groups, with 19.7% in the dnIH group versus 16.8% in the CR group (Fig. 5a). Comparing the proportions of all four cell types studied, only PCs and CD20<sup>+</sup> cells are statistically different between both groups (Fig. 5b). Not only the proportion but also the absolute numbers of CD138 cells/mm<sup>2</sup> differentiate the two groups, with very low numbers found in CR biopsies, similar to those observed in pre- and post-treatment dnIH biopsies (Tables 2, 3). The nature of the immune response is clearly different and specific for each pathological process.



**Table 3** Inflammatory cell count in diagnostic biopsies of 9 patients with CR

Patient	CD138 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>	Total
CR-1	587.9	1529.4	1884.9	743.7	4745.9
CR-2	158.7	624	297.1	32.3	1112.2
CR-3	54.9	333.3	853.3	171.4	1413
CR-4	38.9	244.6	831.4	294.6	1409.5
CR-5	5.8	864.2	2250.7	1036.3	4157
CR-6	92.3	120	966.7	33.3	1212.3
CR-7	45.4	124.4	598.1	183.8	951.7
CR-8	11.6	1688.9	2552.2	531	4783.7
CR-9	4.6	676.9	292.6	556.5	1530.7

Cell number is shown as cells/mm<sup>2</sup>

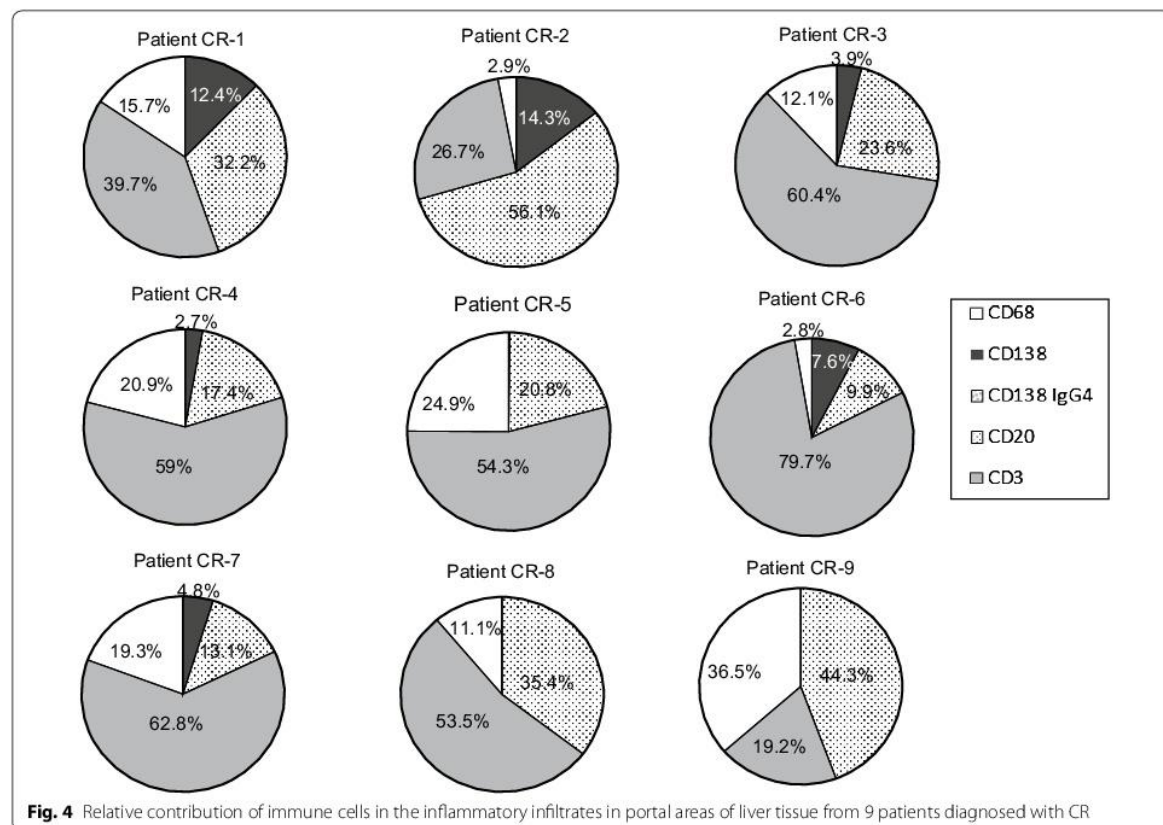
CR, chronic rejection

#### The number of PCs in patients with dnIH decreases after steroid treatment

We had the possibility to analyze 2 follow-up biopsies from patients 3 and 4, obtained 12 and 3 months after initiation of steroid treatment, the treatment of choice

for dnIH in our hospital. We compared the total number of CD138<sup>+</sup> cells in patient biopsies at the time of diagnosis and after steroid treatment. Both follow-up biopsies had an important reduction in the absolute number of PCs after treatment with steroids: from 860.6 to 115.2 in patient 3 and from 1439.2 to 416.3 in patient 4 (Fig. 6a). This reduction favored an increase in the relative abundance of CD3<sup>+</sup> T cells in both follow-up biopsies that was higher than 50%, compared with the mean value in diagnostic biopsies of 36.6%. For CD20<sup>+</sup> B lymphocytes, there was an evident reduction of B cells in the follow-up biopsy for patient 3 with 5.1%, far from the diagnostic value that was 15.7%, close to the mean value in dnIH diagnostic biopsies of 14.9%. Patient 4 had a high number of CD20<sup>+</sup> cells (27.6%) although we do not have data on patient 4's CD20<sup>+</sup> cells at the time of diagnosis (Fig. 6b).

Macrophages were more abundant in patient 3's follow-up biopsy, with 29.3% of the total cells, although not too different from the diagnostic biopsy, at 20.1%. In patient 4, the number of macrophages (9.2%) was lower compared with the mean diagnostic value (19.7%), although the proportion of CD68<sup>+</sup> macrophages was the most



variable among all diagnostic biopsies. The steroid treatment was effective in reducing the number of PCs, whose role in the pathogenic process seems to be relevant as confirmed by the patients' improvement. The cellular profile after treatment was no longer a dnIH profile and was more similar to the profile of the CR group, especially with regards to PCs, for both patients.

#### Cellular changes in the progression to dnIH

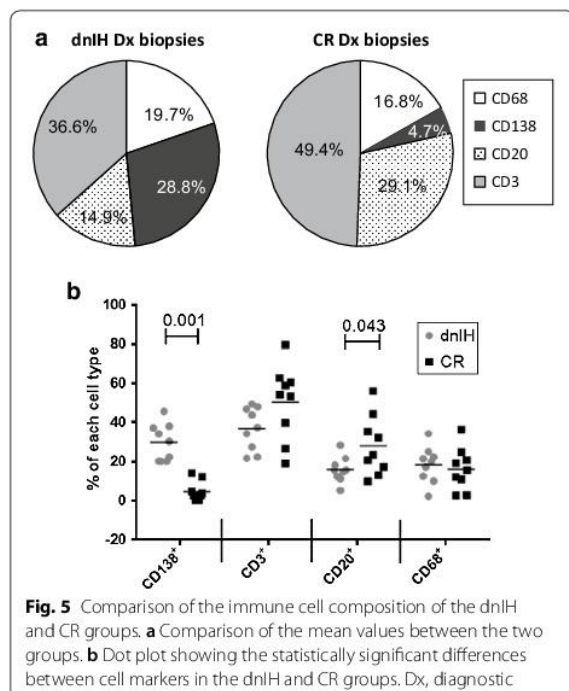
The lack of protocol biopsies makes it very difficult to know the sequential changes in the inflammatory response leading to dnIH. Patient 7 presented with liver dysfunction 3 months after the transplant and the first biopsy (B1) showed histological features of hepatitis C recurrence and grade 1 acute rejection. Five months later, a second biopsy (B2) was necessary because the patient did not show any improvement in liver function. Analysis of B2 led to a dnIH diagnosis and prednisone treatment was prescribed with normalization of the liver enzymes. When we retrospectively analyzed patient 7's

biopsies, we observed that PCs were already present in B1 ( $9.9 + 6.7 = 16.6\%$ ), although not at levels comparable to the general dnIH profile defined in this study. The progression of the immune response was rapid, with a drastic increase in the number of CD138<sup>+</sup> cells reaching 37.1% ( $31.7 + 5.4$ ) PCs in B2. Together with B cells, the humoral arm in B2 represents more than half of the cellular infiltrate, whereas macrophages and T cells were substantially reduced (Fig. 7).

#### Discussion

We defined the cellular types and relative proportions of the inflammatory infiltrates in dnIH diagnostic biopsies and in CR biopsies. The number of each cell type varied from one biopsy to another but the proportions in the dnIH group were similar in all the biopsies analyzed and extremely distinctive from the CR diagnostic biopsies. As expected, the main feature was the high proportion of PCs close to 30% of the total portal inflammatory





**Fig. 5** Comparison of the immune cell composition of the dnIH and CR groups. **a** Comparison of the mean values between the two groups. **b** Dot plot showing the statistically significant differences between cell markers in the dnIH and CR groups. Dx, diagnostic

infiltrate. Within the PC population, IgG4<sup>+</sup> cells represented 17%.

Our hypothesis contemplates that during surgery, intracellular antigens such as the GSTT1 protein are released and become visible to B cells. After binding and internalization, the role of B cells is critical not only because they enter the affinity maturation program and differentiate into memory B cells and plasmatic cells, but also in their role as antigen presenting cells. At the time of diagnosis, the proportion of PCs and CD20<sup>+</sup> cells in patients with dnIH is very characteristic and supports the new definition of dnIH as antibody-mediated rejection [8]. These two parameters are statistically different from the CR group where the presence of PCs is very low or absent and the inflammatory infiltrates are basically formed by CD20<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> lymphocytes, together with macrophages. Not much is known about the presence of PCs in other liver post-transplant pathologies. One study reported a group of patients with acute cellular rejection of liver allografts who showed percentages of PCs from 10% and up to 30% as the severity of acute rejection was

higher [9]. Furthermore, Fiel et al. used a scoring system to determine the ratio of PCs to the rest of the inflammatory infiltrate and found the highest score of PCs in biopsies at the time of de novo AIH diagnosis, which decreased in follow-up biopsies [2].

Furthermore, anti-GSTT1 antibodies are always IgG1 or IgG4 in similar proportions [6], supporting the reported bias towards IgG4<sup>+</sup> PCs [10, 11].

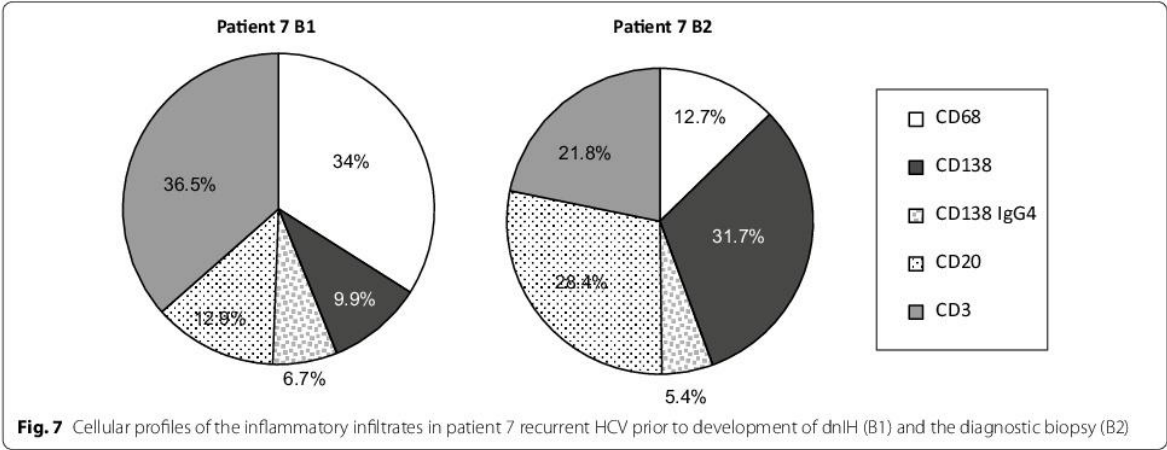
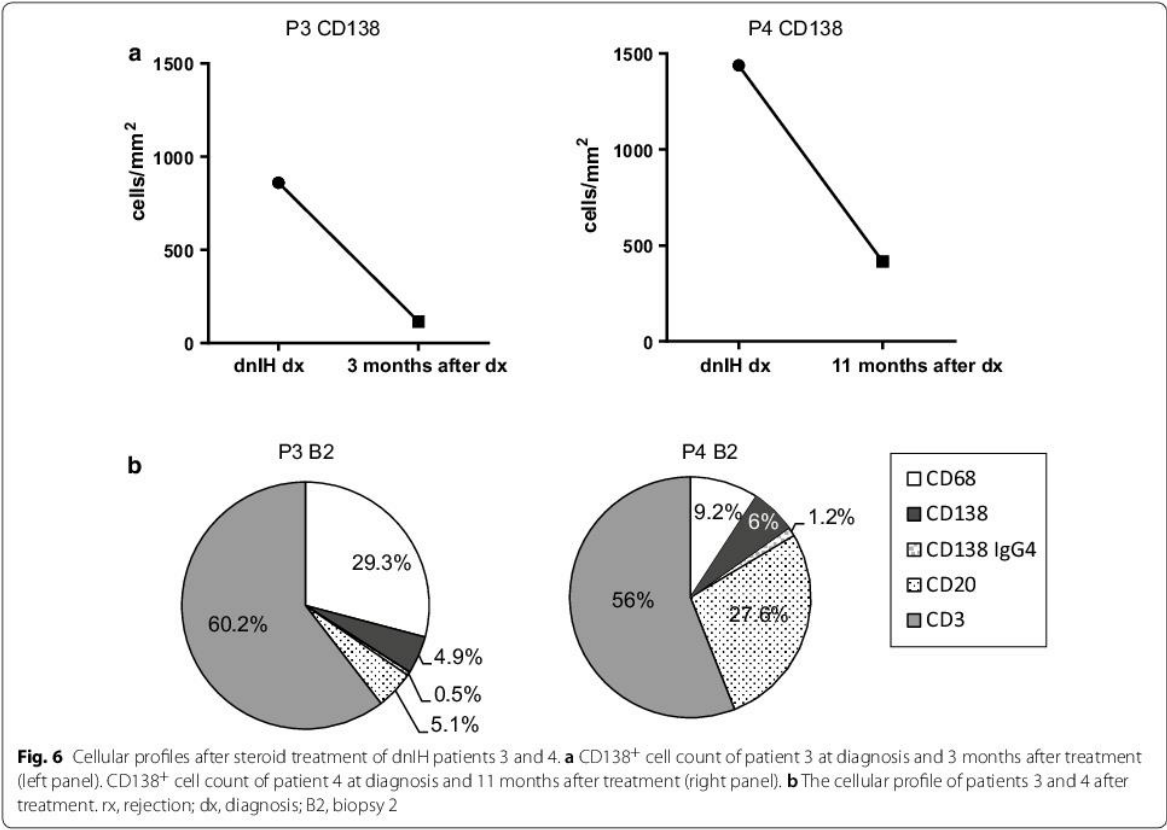
In children, the nature of the inflammatory infiltrate of post-transplant de novo AIH was investigated. Unfortunately, the authors studied T lymphocytes and natural killer cells but not PCs or B cells. They found Th1 polarization but this feature was common to all 3 groups studied regardless of the type of post-transplant pathology, de novo AIH, acute rejection, and AIH [12].

Quantification of the number of cells per area of tissue not only facilitates the comparison with other post-transplant rejection processes, but is also very useful to control the progression to disease or response to treatment by observing changes in the cellular composition in follow-up biopsies. In this study, post-treatment biopsies showed not only a significant reduction in PCs but also in the total number of cells in the inflammatory infiltrates. This result is in accordance with those published by Pongpaibul et al. [13], who observed a reduction in the amount of PC-rich infiltrates in de novo AIH posttreatment biopsies.

In renal transplantation, high number of PCs have been confirmed in a subset of acute and chronic rejection processes acting as indicator of more adverse post-transplant outcomes [14]. In a different report, the number of PCs was found to be higher in CR than in acute rejection biopsies [15]. There seems to be a subset of PC-rich acute rejection distinct from the typical acute rejection, which is associated with poor graft survival [16, 17].

## Conclusions

In summary, this study reveals that there is a specific cellular profile in the portal inflammatory infiltrates associated with the occurrence of dnIH in the liver allograft, perfectly distinguishable from the CR profile, where the main differences reside on the proportion of PCs (sixfold higher) and of B lymphocytes (twofold lower). These findings are in accordance with a potential role for PCs in the pathology of dnIH and



provide an extremely useful diagnostic tool as well as an additional histological marker to follow and evaluate a patient's response to therapy. The fine characterization of the type and number of cells infiltrating the portal areas will contribute to the understanding of the mechanisms involved in this newly defined allograft rejection.

### Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Immunostaining of sequential slides of liver tissue of patient 3 B1.

**Additional file 2: Figure S2.** Representative images of dnlH diagnostic biopsies immunostained for CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. These cells are very abundant in the portal regions but are also disseminated in the capillary sinusoids of the entire tissue. All biopsies are shown at  $\times 200$  magnification with the exception of patient 6, at  $\times 100$  magnification.

**Additional file 3: Figure S3.** Representative images of dnlH diagnostic biopsies stained for CD20<sup>+</sup> B cells. Biopsies from patients (Pat) 2, 6 and 7 shown at  $\times 400$  and Pat 3, 5 and 9 at  $\times 200$  magnification.

**Additional file 4: Figure S4.** Representative images of dnlH diagnostic biopsies stained for CD68<sup>+</sup> macrophages. In some patients an accumulation of macrophages is observed in the portal areas, but in general they are in the capillary sinusoids distributed throughout the entire tissue. All biopsies are shown at  $\times 200$  magnification.

**Additional file 5: Figure S5.** Representative images of dnlH diagnostic biopsies stained for IgG4 plasma cells. All biopsies are shown at  $\times 400$ , with the exception of patient 9, at  $\times 200$  magnification.

### Abbreviations

dnlH: de novo immune hepatitis; PC: plasma cell; CR: chronic rejection; AIH: autoimmune hepatitis; newCAST: new Computer-Assisted System Technology; ROI: regions of interest.

### Authors' contributions

JMS and MAGB were responsible for the patients care and clinical data collection. LG was responsible for the diagnosis in liver biopsy. IA conceived the project. EAD and IA designed and performed the experiments, analyzed the results and wrote the article. ANR provided funding. All authors read and approved the final manuscript.

### Author details

<sup>1</sup> Department of Immunology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain. <sup>2</sup> Department of Pathology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain. <sup>3</sup> Department of Digestive Diseases, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain. <sup>4</sup> Liver Transplant Unit, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain.

### Acknowledgements

This research has been conducted using samples from the Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla Biobank (Andalusian Public Health System Biobank and ISCIII-Red de Biobancos PT13/0010/0056).

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Availability of data and materials

All data needed to conclude the study is provided within this publication.

### Consent for publication

Patients were not required to give informed consent to this study because they have been enrolled in previous projects and this was a continuation of the research for which they gave a general consent.

### Ethics approval and consent to participate

Experimental protocols were strictly conducted in accordance with the ethical guidelines for biomedical research on human subjects contained in 'Declaración de Helsinki'. All the donors provided informed consent in writing. No child was involved in this study.

### Funding

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Instituto de Salud Carlos III, Grants 17/1403 and 11/857, and the Andalusian government, Proyecto de Excelencia CTS-7846. IA is a senior researcher from the Nicolás Monardes program.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 27 October 2017 Accepted: 5 March 2018

Published online: 13 March 2018

### References

1. Aguilera I, Sousa JM, Gavilán F, Bernardos A, Wichmann I, Nuñez-Roldán A. Glutathione S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2004;10(9):1166–72.
2. Fiel M, Agarwal K, Stanca C, Eihaji N, Kontorinis N, Thung SN. Posttransplant plasma cell hepatitis (de novo autoimmune hepatitis) is a variant of rejection and may lead to a negative outcome in patients with hepatitis C Virus. *Liver Transplant*. 2008;14(6):861–71.
3. Evans HM, Kelly DA, McKiernan PJ, Hübscher S. Progressive histological damage in liver allografts following pediatric liver transplantation. *Hepatology*. 2006;43(5):1109–17.
4. Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, García-Lozano JR, et al. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(3):535–9.
5. Aguilera I, Sousa JM, Praena JM, Gómez-Bravo MA, Nuñez-Roldán A. Choice of calcineurin inhibitor may influence the development of de novo immune hepatitis associated with anti-GSTT1 antibodies after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2011;25(2):207–12.
6. Aguilera I, Martínez-Bravo MJ, Sousa JM, Pozo-Borrego AJ, Nuñez-Roldán A. IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant de novo immune hepatitis. *Clin Transplant*. 2016;30(3):210–7.
7. Adeyi O, Fischer SE, Guindi M. Liver allograft pathology: approach to interpretation of needle biopsies with clinicopathological correlation. *J Clin Pathol*. 2010;63(1):47–74.
8. Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, et al. Comprehensive update of the Banff Working Group on liver allograft pathology: introduction of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2016;16:2816–35.
9. Alexander J, Chu W, Swanson PE, Yeh MM. The significance of plasma cell infiltrate in acute cellular rejection of liver allografts. *Hum Pathol*. 2012;43(10):1645–50.
10. Zhao XY, Rakhda MA, Wang TJ, Jia JD. Immunoglobulin G4-associated de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation for chronic hepatitis B- and C-related cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case report with literature review. *Transplant Proc*. 2013;45(2):824–7.
11. Castillo-Rama M, Sebah M, Sasatomi E, Randhawa P, Isse K, Salgarkar AD, et al. 'Plasma cell hepatitis' in liver allografts: identification and characterization of an IgG4-rich cohort. *Am J Transplant*. 2013;13(11):2966–77.
12. Hadžić N, Quaglia A, Cotoi C, Hussain MJ, Brown N, Vergani D, et al. Immunohistochemical phenotyping of the inflammatory infiltrate in de



- novo autoimmune hepatitis after liver transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2012;16(5):501–10.
13. Pongpaibul A, Vernik R, McDiarmid S, Lassman C. Histopathology of de novo autoimmune hepatitis. *Liver Transplant*. 2012;18:811–8.
  14. Gärtner V, Eigentler TK, Viebahn R. Plasma cell-rich rejection processes in renal transplantation: morphology and prognostic relevance. *Transplantation*. 2006;81(7):986–91.
  15. Nadasdy T, Krenács T, Kalmár KN, Csajbók E, Boda K, Ormos J. Importance of plasma cells in the infiltrate of renal allografts. *Pathol Res Pract*. 1991;187(2–3):178–83.
  16. Charney DA, Nadasdy T, Lo AW, Racusen LC. Plasma cell-rich acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 1999;68(6):791–7.
  17. Desvaux D, Le Gouvello S, Pastural M, Abtahi M, Suberbielle C, Boeri N, et al. Acute renal allograft rejections with major interstitial oedema and plasma cell-rich infiltrates: high gamma-interferon expression and poor clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(4):933–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)







### **Publicación 3**

3. *“Rethinking de novo immune hepatitis, an old concept for liver allograft rejection: relevance of glutathione S-transferase T1 mismatch”*

Autores: Isabel Aguilera, Elena Aguado Domínguez, José Manuel Sousa y Antonio Núñez Roldán.

*World Journal of Gastroenterology* 2018; 24(29):3239-3249

## Rethinking *de novo* immune hepatitis, an old concept for liver allograft rejection: Relevance of glutathione S-transferase T1 mismatch

Isabel Aguilera, Elena Aguado-Dominguez, Jose Manuel Sousa, Antonio Nuñez-Roldan

Isabel Aguilera, Elena Aguado-Dominguez, Antonio Nuñez-Roldan, Department of Immunology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla 41013, Spain

Jose Manuel Sousa, Digestive and Liver Diseases Service, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla 41013, Spain

ORCID number: Isabel Aguilera (0000-0003-2165-4954); Elena Aguado-Dominguez (0000-0003-1519-6002); Jose Manuel Sousa (0000-0002-8158-273X); Antonio Nuñez-Roldan (0000-0001-6479-2586).

**Author contributions:** Aguilera I contributed to this paper with the conception, literature review and drafting; Aguado-Dominguez E contributed with literature review, original data and drafting; Sousa JM and Nuñez-Roldan A contributed with critical revision of the manuscript and approval of the final version.

**Supported by** Andalusian Government, Proyecto de Excelencia, No. CTS-7846; and Spanish Ministry of Economy, Instituto de Salud Carlos III, No. 11/857 and No. 17/1403.

**Conflict-of-interest statement:** No potential conflicts of interest. No financial support.

**Open-Access:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Invited manuscript

**Correspondence to:** Isabel Aguilera, PhD, Research Fellow, Senior Scientist, Department of Immunology, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Avda Manuel Siurot s/n, Sevilla 41013, Spain. [iaguilera-ibis@us.es](mailto:iaguilera-ibis@us.es)

Telephone: +34-955923120

Received: May 3, 2018

Peer-review started: May 4, 2018

First decision: May 17, 2018

Revised: June 28, 2018

Accepted: June 30, 2018

Article in press: June 30, 2018

Published online: August 7, 2018

### Abstract

Antibody-mediated rejection (AMR) in liver transplantation has long been underestimated. The concept of the liver as an organ susceptible to AMR has emerged in recent years, not only in the context of the major histocompatibility complex with the presence of HLA donor-specific antibodies, but also with antigens regarded as "minor", whose role in AMR has been demonstrated. Among them, antibodies against glutathione S-transferase T1 have been found in 100% of patients with *de novo* autoimmune hepatitis (dnAIH) when studied. In its latest update, the Banff Working Group for liver allograft pathology proposed replacing the term dnAIH with plasma cell (PC)-rich rejection. Antibodies to glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in null recipients of GSTT1 positive donors have been included as a contributory but nonessential feature of the diagnosis of PC-rich rejection. Also in this update, non-organ-specific anti-nuclear or smooth muscle autoantibodies are no longer included as diagnostic criteria. Although initially found in a proportion of patients with PC-rich rejection, the presence of autoantibodies is misleading since they are not disease-specific and appear in many different contexts as bystanders. The cellular types and proportions of the inflammatory infiltrates in diagnostic biopsies have been studied in detail very recently. PC-rich rejection



biopsies present a characteristic cellular profile with a predominance of T lymphocytes and a high proportion of PCs, close to 30%, of which 16.48% are IgG4<sup>+</sup>. New data on the relevance of GSTT1-specific T lymphocytes to PC-rich rejection will be discussed in this review.

**Key words:** Glutathione S-transferase T1 mismatch; Liver allograft rejection; Plasma cell-rich rejection; *De novo* autoimmune hepatitis; Donor-specific antibodies; NewCAST; Cell quantification; IgG4<sup>+</sup> plasma cell; T lymphocytes

© The Author(s) 2018. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** The purpose of this review is to update the reader with recent knowledge about a disease of the liver allograft, whose definition has evolved from “*de novo* autoimmune hepatitis” to “plasma cell-rich rejection”. During the last 20 years, several groups have contributed new data that has prompted the liver transplant community to reconsider several aspects of the disease. It is not the intention of this review to go over details of the histological features or the role of autoantibodies in this disease, which have been well described in other reviews. Instead, more recent aspects, such as the composition of infiltrates in biopsies and T cell involvement will be discussed.

Aguilera I, Aguado-Dominguez E, Sousa JM, Nuñez-Roldan A. Rethinking *de novo* immune hepatitis, an old concept for liver allograft rejection: Relevance of glutathione S-transferase T1 mismatch. *World J Gastroenterol* 2018; 24(29): 3239-3249 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v24/i29/3239.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v24.i29.3239>

## INTRODUCTION

Antibody-mediated rejection (AMR) in liver transplantation is becoming increasingly relevant after being considered an immune privileged organ for many years. Indeed, a good HLA match between donor and recipient - very important in other settings such as kidney transplants - was never considered as essential in liver donations. A few years ago, a number of publications describing a pathogenic role for HLA donor-specific antibodies (DSA) came out indicating that the liver was prone to experience AMR like any other organ<sup>[1]</sup>. Earlier, in 1998, a new liver transplant-associated disease termed *de novo* autoimmune hepatitis (dnAIH) was described<sup>[2]</sup> and many groups reported cases of patients with similar characteristics but with different prevalence<sup>[3-25]</sup>. The diagnostic criteria are well described, particularly with regard to histological features that are essential for differential diagnosis in adult<sup>[26-32]</sup> and pediatric<sup>[9,33]</sup> cases. To complete the characterization of this special type of immune response, now generally accepted as rejection

but with disconcerting similarities with autoimmunity<sup>[34]</sup>, there are a few aspects that still need to be investigated.

For example, one important issue that has yet to be addressed is the role of allelic disparity of glutathione S-transferase T1 (GSTT1) or other minor histocompatibility antigen mismatches in the development of dnAIH in pediatric liver transplant. There are very few studies about the long-term consequences of dnAIH in the liver allograft of children. Ekong *et al.*<sup>[14]</sup> reported their observations from a retrospective multi-center study that included 29 children from 5 centers. The authors showed that half of the patients did not experience rejection prior to diagnosis and the response to steroid therapy was good in general but not in all the cases. Interestingly, 38% of the children had abnormal liver enzymes over 2-fold the upper limit of normal, especially gamma-glutamyltransferase (GGT) at the time of last follow-up, indicating bile duct injury. This result contradicts one of the main arguments against considering dnAIH a type of rejection, namely the absence of bile duct involvement.

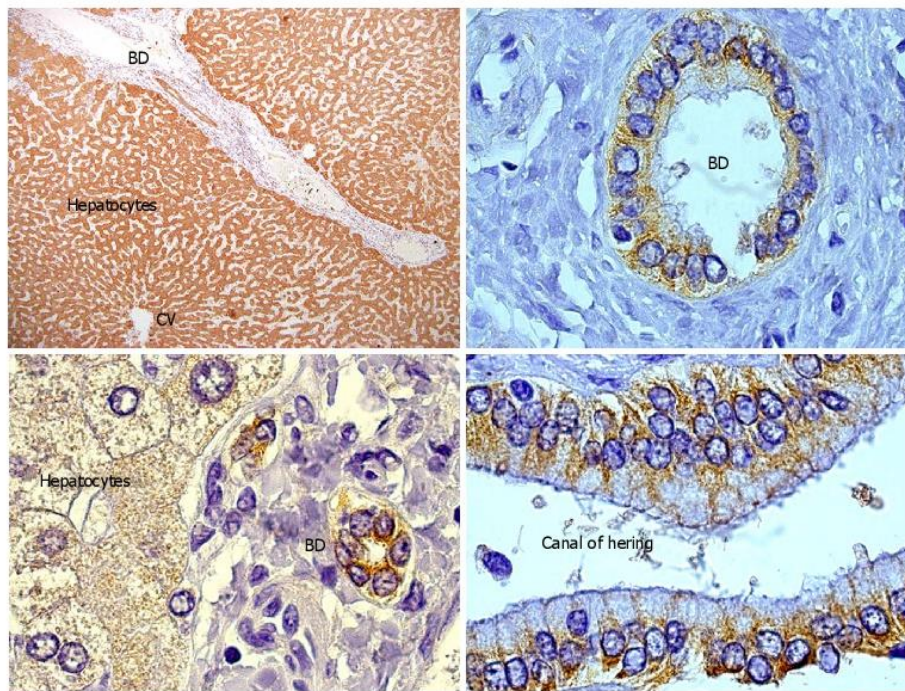
Well-established immunological criteria for diagnosing AMR in kidney transplantation include detection of complement component 4d (C4d) deposits in peritubular capillaries concomitantly with antidonor serology<sup>[35]</sup>. Presently, C4d deposition in portal capillaries is accepted as a distinctive feature of dnAIH/PC hepatitis<sup>[36,37]</sup> although it is not currently considered to be a diagnostic criterion.

IgG4 has been traditionally considered a benign antibody although this concept has changed due to the growing number of IgG4-related diseases described in the literature during the last few years. International experts in the field held a symposium in Boston in 2012 and generated consensus guidelines for the diagnosis of IgG4-related diseases<sup>[38]</sup>. Since an important presence of IgG4<sup>+</sup> plasma cells (PCs) has been detected in subgroups of patients with dnAIH/PC-rich rejection, this aspect will be discussed later in this review.

## TERMINOLOGY CONTROVERSY

When pathologists first identified the transplant-associated pathology dnAIH, the histological features described were very similar to those found in autoimmune hepatitis<sup>[2]</sup>. Following this first study in 1998<sup>[2]</sup>, dnAIH became the term of choice<sup>[6-8,11,12,17,22,25,39,40]</sup>. However, from the beginning, clinicians found it difficult to admit progression to autoimmunity in a patient's graft without a previous history of autoimmune phenomena and under the effects of immunosuppressive therapy. Moreover, the graft targeted by the immune reaction was not self but coming from a donor with a completely different genetic background, given the fact that selection was very uncommon, even for the HLA antigens. Soon after the first description, some authors started using other terms such as “*de novo* hepatitis”<sup>[3]</sup>, “graft dysfunction mimicking autoimmune hepatitis”<sup>[16]</sup>, “posttransplant immune hepatitis”<sup>[4]</sup> or *de novo* immune





**Figure 1** GSTT1 expression in human liver. On the left part of the figure the hepatic parenchyma shows homogeneous staining of the cytoplasm of hepatocytes as well as epithelial cells of the bile ducts in the portal area. On the right part, a detail of the cytoplasmic staining of cholangiocytes and the Canal of Hering cells, considered a niche of hepatic progenitor cells. CV: Central vein; BD: Bile duct.

hepatitis<sup>[18]</sup>. In 2008, a study performed by Fiel *et al.*<sup>[23]</sup> introduced the term “plasma cell hepatitis” with the suggestion that dnAIH could be a variant of rejection; this report was highlighted by an editorial comment<sup>[34]</sup>. Even though all these terms have been used historically, for simplicity, in this review we will refer to dnAIH or PC-rich rejection.

### GLUTATHIONE S-TRANSFERASE T1: A MINOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN

GSTT1 is a phase II drug metabolizing enzyme involved in protection against toxic compounds. Vital for this function is its abundant expression in liver and kidney (Figure 1), although GSTT1 is also expressed in other tissues to a lesser degree. Importantly, the GSTT1 antigen is present in red blood cells. It has been demonstrated that any healthy person with the *GSTT1\*0/0* genotype might produce anti-GSTT1 antibodies if they experience one of two sensitization events: blood transfusions from a GSTT1-positive donor or pregnancy of a GSTT1-positive fetus<sup>[41]</sup>. Mismatch of the GSTT1 alleles was first reported by Aguilera *et al.*<sup>[42]</sup> and subsequently confirmed in patients with PC-rich rejection<sup>[18,21,24,43]</sup>. Czaja included GSTT1 antibodies as a feature in dnAIH patients and proposed a hypothesis that will be discussed in the PATHOGENESIS OF PC-RICH REJECTION section of this manuscript<sup>[44]</sup>. Controversially, one report did not find GSTT1 mismatch

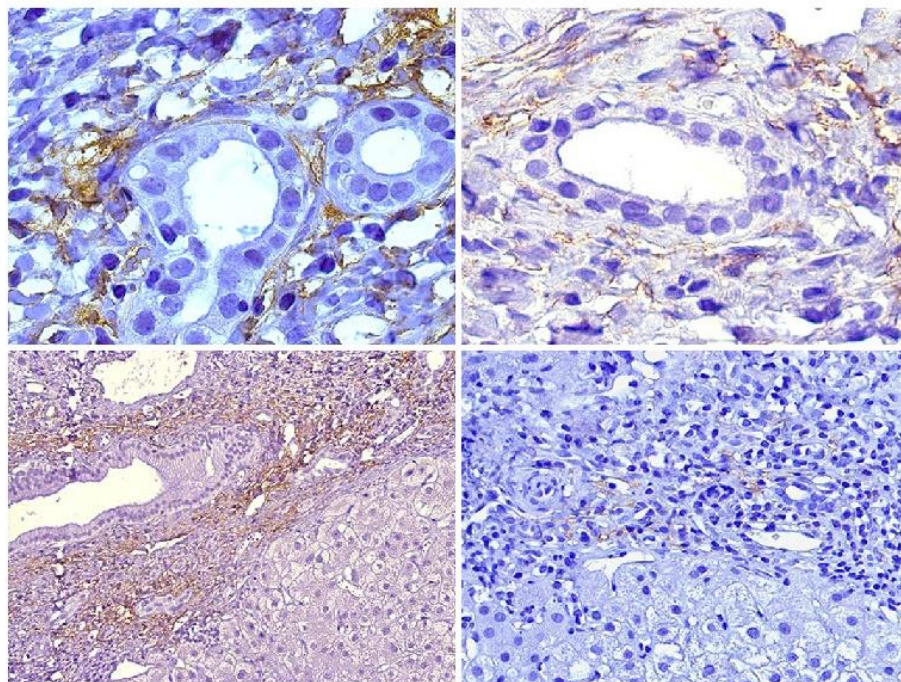
in a patient with dnAIH; however, the genotyping results were not very convincing since they lacked an internal control band and GSTT1 antibodies were not tested<sup>[22]</sup>. To the best of our knowledge, anti-GSTT1 antibodies have never been tested in serum samples from liver transplanted children.

We studied the cases of two female patients with preformed anti-GSTT1 antibodies who needed a liver transplant and received a GSTT1 expressing graft. Their original diseases were primary and secondary biliary cirrhosis, respectively. The first patient presented high titers of GSTT1 antibodies and was diagnosed with dnAIH 12 mo after the transplant with a good response to prednisone plus mycophenolate mofetil. She died of pneumonia 4 years after the transplant. The second patient had low antibody titers in different samples until exitus, 7 years after the transplant. This patient was never diagnosed correctly and the only biopsy, performed one month before exitus, revealed dnAIH as the cause of exitus. Since these pre-sensitized patients are not frequent, it is difficult to conclude whether the presence of preformed antibodies accelerates the onset or the severity of the disease.

### IN FAVOR OF ANTIBODY-MEDIATED REJECTION IN *DE NOVO* AIH

At the beginning of this decade a report by Aguilera *et al.*<sup>[36]</sup>, that was worth an editorial comment<sup>[45]</sup> was





**Figure 2** Portal areas in diagnostic biopsies of patients with plasma cell-rich rejection are shown. Staining of C4d deposits is observed in portal capillaries indicating antibody-mediated rejection.

the first to link C4d immunopositivity in liver biopsies to donor-specific alloreactivity not related to HLA DSA or ABO incompatibility<sup>[46]</sup>. Patients with anti-GSTT1 DSA showed a very characteristic C4d immunostaining pattern restricted to portal capillaries (Figure 2), very distinct to the sinusoidal pattern described by Kozłowski *et al.*<sup>[47]</sup> in association with HLA DSA, which was similar to our own findings in chronic rejection biopsies<sup>[36]</sup>.

Dumortier *et al.*<sup>[48]</sup> described a case of refractory dnAIH that did not respond to standard therapy in a patient with anti-LKM (liver-kidney microsomal) antibodies at the time of diagnosis. Recovery after treatment with plasmapheresis supported an involvement of humoral factors in the pathogenesis of the disease.

In the last publication by the Banff Working Group for liver allograft pathology, the proposed criteria included HLA DSA and GSTT1 in null recipients of GSTT1<sup>+</sup> positive donors as contributory but nonessential features for the diagnosis of PC-rich rejection<sup>[1]</sup>.

HLA DQ DSAs have been described as a predictive variable for late allograft dysfunction in children<sup>[49]</sup>. Unfortunately, the number of patients in this study with dnAIH ( $n = 3$ ) was too low to reach a conclusion and, even with the inclusion of 10 more patients with overlapping features of dnAIH and late ACR, the results should be considered carefully since it is not possible to analyze both events separately. We studied HLA DSA in a group of adult patients with dnAIH and found that 4 out of 14 (28.6%) produced *de novo* HLA DQ DSA, but always coexisting with GSTT1 DSAs (unpublished

results), making it impossible to differentiate the real impact of HLA DSA on the development of PC-rich rejection. It would be very interesting to validate these results in larger cohorts in order to determine the pathogenic role of HLA DSA in the absence of anti-GSTT1 antibodies.

## THE THIN LINE BETWEEN AUTO- AND ALLO-IMMUNITY

Although finally accepted as a form of allograft rejection, the liver transplant-associated disease formerly known as dnAIH is a special kind of rejection and one that is difficult to understand. It has many histological similarities with classical AIH, features that were misleading at the time this pathology was discovered. Moreover, the first-line therapy of choice is corticosteroids for both pathological processes. All of this supports the concept that an alloantigenic immune response may be difficult to distinguish from an autoimmune response in which the mechanisms of liver damage are probably similar. Interestingly, we noted a female predominance among patients who present with one autoimmune feature, since of the cases of dnAIH diagnosed at our center, 10 of 14 are female (71.4%), a feature that is not easy to explain if we contemplate that 75% of the liver transplanted patients in our hospital are males. Moreover, if we consider the 122 patients within the risk group with GSTT1 mismatch (positive donor/null recipient), 85 were males (69.7%) and 37 were females (30.3%). In



**Table 1** Reported cases of de novo autoimmune hepatitis in pediatric and adult liver transplantation

Ref.	de novo AIH/total patients	Original disease (Immune-mediated)	Initial calcineurine inhibitor	Pediatric/adult
Kerker <i>et al</i> <sup>[72]</sup> (1998)	7/180	4 BA	4 CyA, 3 Tac	P
Gupta <i>et al</i> <sup>[93]</sup> (2001)	6/115	5 BA	6 CyA	P
Andries <i>et al</i> <sup>[94]</sup> (2001)	11/471	7 BA	10 CyA, 1 Tac	P
Hernández <i>et al</i> <sup>[95]</sup> (2001)	5/155	4 BA, 1 PSC	5 CyA	P
Petz <i>et al</i> <sup>[96]</sup> (2002)	18/155	16 BA	9 CyA, 9 Tac	P
Miyagawa-Hayashino <i>et al</i> <sup>[77]</sup> (2003)	1	BA	Tac	P
Gibelli <i>et al</i> <sup>[98]</sup> (2006)	2/206	1 BA	CyA	P
Evans <i>et al</i> <sup>[99]</sup> (2006)	4/158	4 PSC	4 CyA	P
Riva <i>et al</i> <sup>[100]</sup> (2006)	9/247	9 BA	5 CyA, 4 Tac	P
Oya <i>et al</i> <sup>[111]</sup> (2009)	1	-	Tac	P
Cho <i>et al</i> <sup>[122]</sup> (2011)	4/148	1 BA	-	P
Pongpaibul <i>et al</i> <sup>[131]</sup> (2012)	51/685	29 BA	22 CyA, 29 Tac	P
Ekong <i>et al</i> <sup>[141]</sup> (2017)	29/1833	17 BA	13 CyA, 16 Tac	P
Jones <i>et al</i> <sup>[153]</sup> (1999)	2	2 PBC	2 CyA	A
Heneghan <i>et al</i> <sup>[164]</sup> (2001)	7/1000	1 PBC, 2 PSC	7 CyA	A
Salcedo <i>et al</i> <sup>[157]</sup> (2002)	12/350	1 BA, 1 PSC	12 CyA	A
Aguilera <i>et al</i> <sup>[118]</sup> (2004)	6/110	None	5 CyA, 1 Tac	A
<sup>1</sup> Update 2017	8	1 PBC, 1 PSC	8 CyA	A
Miyagawa-Hayashino <i>et al</i> <sup>[100]</sup> (2004)	13/633	11 BA	13 Tac	A
Tsuji <i>et al</i> <sup>[120]</sup> (2005)	1	PBC	CyA	A
Rodriguez-Diaz <i>et al</i> <sup>[121]</sup> (2006)	1	PBC	CyA	A
Yoshizawa <i>et al</i> <sup>[122]</sup> (2008)	1	PBC	Tac	A
Fiel <i>et al</i> <sup>[123]</sup> (2008)	38/?	none (HCV)	11 CyA, 27 Tac	A
Zhang <i>et al</i> <sup>[124]</sup> (2010)	1	PBC	Tac	A
Montano-Loza <i>et al</i> <sup>[125]</sup> (2012)	17/576	5 PBC, 1 BA	5 CyA, 7 Tac	A

<sup>1</sup>Presently we have 8 more patients diagnosed. BA: Biliary atresia; PBC: Primary biliary cirrhosis; PSC: Primary sclerosing cholangitis; CyA: Cyclosporine A; Tac: Tacrolimus; A: Adult; P: Pediatric.

accordance with female predominance are the reports by Miyagawa-Hayashino<sup>[7,19]</sup>, in which 12 of 14 cases were females, and Pongpaibul *et al*<sup>[131]</sup> with 32 females vs 19 males diagnosed with dnAIH, although in the majority of publications this predominance does not appear. Ward *et al*<sup>[50]</sup> established that women may be more susceptible to PC hepatitis after liver transplant than men. A reasonable explanation could be sensitization through pregnancies. In fact, we have two female patients with GSTT1 antibodies in pre-transplant serum samples, although we do not have a sufficient number of cases to support this hypothesis.

### AUTOIMMUNE OR IMMUNE MEDIATED PRETRANSPLANT PATHOLOGIES: HAVE THEY ANY INFLUENCE IN PC-RICH REJECTION?

It is generally accepted that dnAIH develops in patients transplanted for non-autoimmune diseases. This is not exactly true since there are a number of patients whose original disease was either primary biliary cirrhosis (PBC) or primary sclerosing cholangitis (PSC) (Table 1). Neuberger's group found that PBC was an independent predictor of late acute rejection in a large cohort of adult liver transplant patients<sup>[51]</sup>.

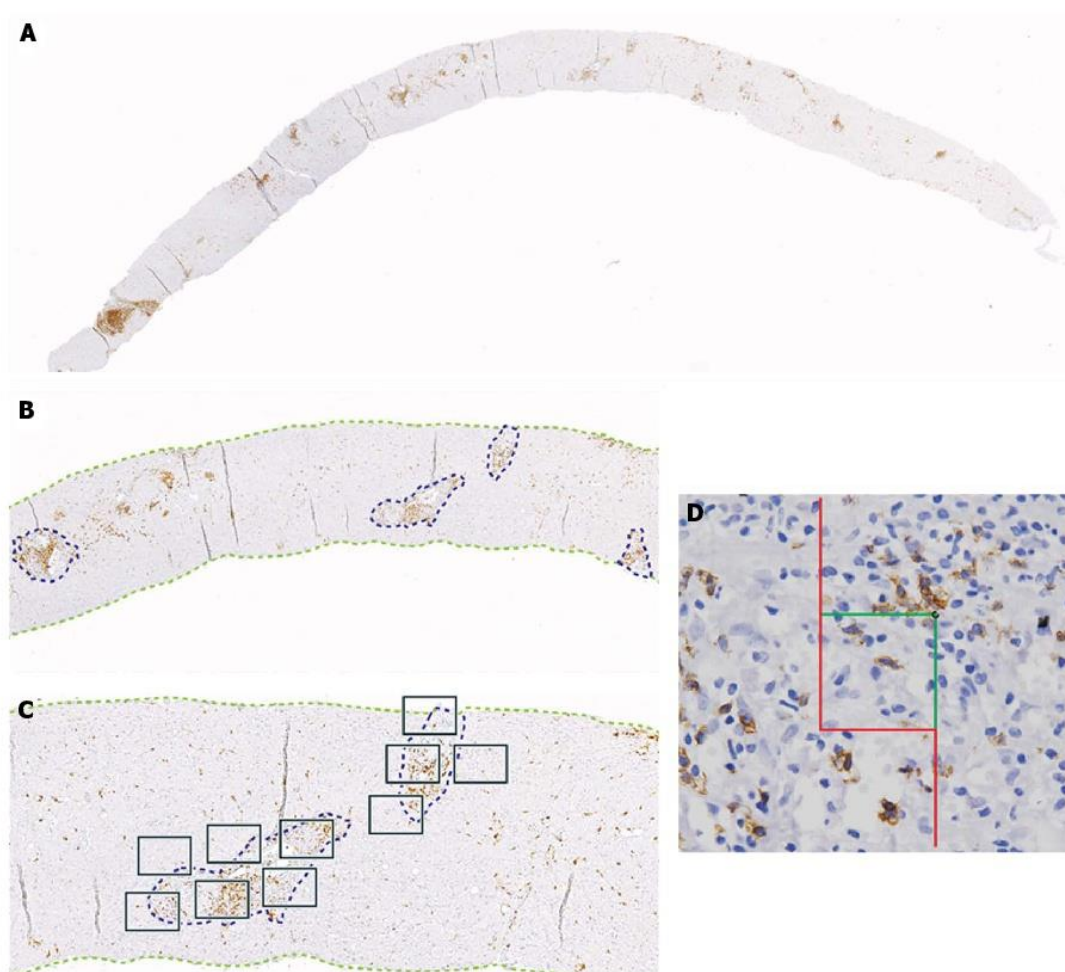
In children, the major indication for liver transplant is

biliary atresia (BA), a process of unknown etiology with several potential causative factors. Among them, there is evidence in favor of autoimmune-mediated injury of bile duct epithelial cells in a subset of patients<sup>[52-54]</sup>. Very recently, a study described that BA is initiated before birth and the presence of maternal microchimerism in the BA liver supports graft versus host disease (GvHD)-like immune response<sup>[55]</sup>.

### T CELL INVOLVEMENT IN PC-RICH REJECTION

A possible role of GSTT1-specific T lymphocytes in PC-rich rejection has been recently investigated. The authors provided the first evidence of memory specific T cells in samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients after recall with the GSTT1 antigen. Activation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells with production of IL-4 and/or IFN $\gamma$  was observed<sup>[56]</sup>. Most intriguing was the finding of highly activated CD4<sup>+</sup> cells that retained CD8<sup>low</sup> expression with a mean value of 25% activated Th0 type cells (3.44%-78.95%). These results are particularly significant considering the immunosuppressed status of the patients. In silico analysis of the ability of patients' HLA class I and class II alleles to present these peptides with optimal percentile ranks supported the experimental results<sup>[56]</sup>.

Similar to autoimmune hepatitis, we observe damage



**Figure 3** Representative images showing quantification procedure using NewCAST™ Visiopharm® software. A: Super image capture of a slide; B: Computer-assisted drawing of the tissue (green) and manually drawing of the regions of interest (ROI) or portal areas (blue); C: Example of the unbiased sampling; D: A detail of cell quantification inside the counting frame.

to hepatocytes that is believed to be coordinated by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes recognizing a self-antigen presented by HLA-class II molecules to Th0 type cells<sup>[57]</sup>, although with the substantial difference that, in this case, the target is an alloantigen.

### WHICH CELLS ARE INFILTRATING THE LIVER AT THE ONSET OF PC-RICH REJECTION?

Diagnosis by liver biopsy is challenging because PC-rich rejection shares some histological and clinical features with late onset acute rejection or with other post-transplant pathologies such as recurrent hepatitis C. Moreover, very little is known about the cellular composition of the inflammatory infiltrates in portal tracts other than an important presence of plasma cells. Direct visualization of the cell types with different

markers and quantification of cells/mm<sup>2</sup> of tissue in diagnostic biopsies using computer-assisted system technology (newCAST) has proved to be an unbiased way to evaluate the situation directly in the organ and not only in peripheral blood (Figure 3). Very recent data allowed us to define a cellular profile characteristic of PC-rich rejection at the time of diagnosis<sup>[58]</sup>. We observed a predominance of T lymphocytes (mean 36.6%); followed by PCs (mean 28.8%), with 17% of them IgG4<sup>+</sup>; B cells (mean 14.9%); and macrophages (mean 19.7%) (Figure 4). This profile was very different to the one defined in a chronic rejection group included in the same study<sup>[58]</sup>. It remains to be confirmed whether the cellular composition in acute rejection biopsies would be useful to support diagnosis since HCV recurrence no longer has the same impact in the transplant community that as in the past.

The IgG4 subclass has traditionally been considered a modulator of the immune response, linked to long-



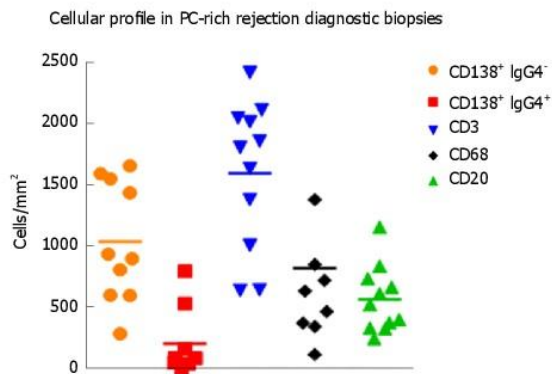


Figure 4 Total cell count/ area of tissue in diagnostic biopsies with the following markers: CD138<sup>+</sup> plasma cells, IgG4<sup>+</sup> plasma cells, CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD68<sup>+</sup> macrophages, CD20<sup>+</sup> B lymphocytes. Mean values are shown.

term exposure and high antigen concentration. Some authors analyzed the presence of IgG4 antibodies in dnAIH, mostly in children, but the results were contradictory. While Eguchi *et al.*<sup>[59]</sup> described the absence of IgG4<sup>+</sup> plasma cells in the biopsies of 4 patients and the values in serum were within normal limits, Castillo-Rama *et al.*<sup>[60]</sup> detected IgG4<sup>+</sup> PC over-representation in a subgroup of patients with PC hepatitis that showed a more severe disease course. The origin of these IgG4<sup>+</sup> PC infiltrates in the allografts is unknown but it could be due to persistent alloimmune responses. We also found an important number of IgG4<sup>+</sup> PC, representing 16.48% (2.45%-65%) of the total PCs in diagnostic biopsies of patients with PC-rich rejection (Figure 5A and B); however, higher numbers of IgG4<sup>+</sup> cells was not associated with worse clinical outcome. We also found an over-representation of serum levels of GSTT1-specific IgG4 antibodies, almost equaling the levels of GSTT1-IgG1, while GSTT1-IgG2 and -IgG3 were completely absent (Figure 5C)<sup>[61]</sup>.

There is very little information about the representation of T cells in PC-rich rejection biopsies. A study performed by Ekong *et al.*<sup>[62]</sup> found that around 3000 CD3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> were present in the dnAIH pediatric group during disease activity. Our data in adults showed that CD3<sup>+</sup> cells were less numerous, with a mean value of 1600 (641-2422) cells/mm<sup>2</sup> at the time of diagnosis, before steroid treatment. Indirect evidence from biopsies suggests a potential role for Th17 cells in the prolongation of inflammation in dnAIH<sup>[63]</sup> although this needs further study.

## PC-RICH REJECTION IN HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION

PC-rich rejection has also been identified after hematopoietic cell transplantation (HCT) between HLA-identical siblings. In this context, the GSTT1 mismatch, defined as null donor/positive recipient, not only had a

deleterious effect in HCT and constituted a risk factor for acute and chronic hepatic GvHD<sup>[64]</sup> but is also the basis of a true PC-rich rejection<sup>[65]</sup>. Together with the skin and intestine, the liver is a preferred target of the donor cells which are able to recognize disparate antigens expressed by the recipient. Differential diagnosis of hepatic GvHD versus PC-rich rejection must be done in biopsy because histological features can only be analyzed in tissue to permit the differentiation of both processes. As it happens, the cellular composition of the inflammatory infiltrates in portal areas of HCT patient with PC-rich rejection was very similar to that of diagnostic biopsies of liver transplanted patients<sup>[58]</sup>.

From an immunological point of view, this finding has important implications because it demonstrates an identical immune response against the GSTT1 antigen as a result of donor/recipient mismatch in two completely different conditions: Solid organ and HCT.

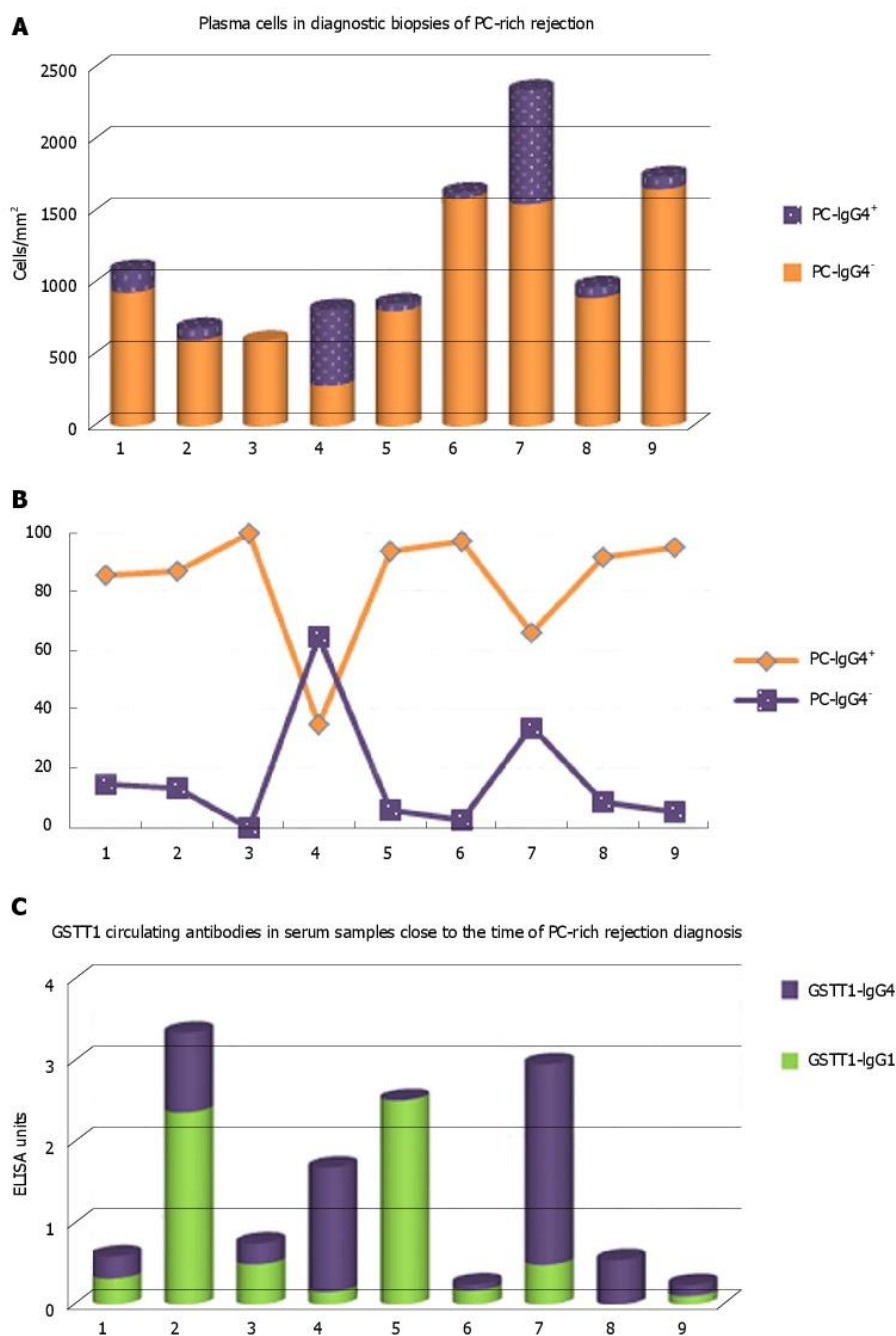
## PATHOGENESIS OF PC-RICH REJECTION

It is clear that during surgery, intracellular antigens such as the GSTT1 protein are released and recognized by B cells, starting a process of affinity maturation and differentiation into memory cells, which requires collaboration with specific T helper cells in the lymph nodes. If this occurs, a subset of these cells will progress to plasma cells and anti-GSTT1 antibodies of the IgG class will be detected concurrently with mature GSTT1-specific CD4<sup>+</sup> cells. Our experimental results sustain indirect presentation of the donor GSTT1 protein by recipient APCs<sup>[56]</sup>.

In general terms, we could use the model proposed by Czaja<sup>[44]</sup> with some suggestions. Briefly, inflammatory stimuli induce expression of MHC class II in hepatocytes and cholangiocytes and, since both cellular types contain abundant GSTT1 enzyme, these liver cells could directly act as APCs and serve as targets of effector CD4<sup>+</sup> T cells, whose existence has been also demonstrated in the PBMC of patients with the disease. The presence of an antigen mimicking GSTT1 on the surface of the cell cannot be ruled out but it does not seem necessary and so far has not been identified.

GSTT1-specific B cells have a critical role as antigen presenting cells (APCs) in the maintenance of a long-lasting immunological response, providing the signals required for specific T cell activation when professional APCs become exhausted. GSTT1 antibodies are, in principle and until a direct pathogenic role can be demonstrated, a signal of the existence of memory B cells. The mechanisms controlling GSTT1-specific T cell response in patients that, in spite of the production of GSTT1 antibodies, do not develop the disease are still not known. Alternatively, there are patients with GSTT1-specific T cells that lack the B cell response; they will never develop PC-rich rejection. In our experience, if PC-rich rejection is not initiated during the first 3 years, it will never occur even though anti-





**Figure 5** CD138<sup>+</sup> plasma cells were quantified in the diagnostic biopsies of the 7 patients (A). The results are shown as number of cells per mm<sup>2</sup>/tissue. IgG4<sup>+</sup> plasma cells were also counted and subtracted from the total number of CD138<sup>+</sup> cells. B: The same results are represented as percentages. C: Level of anti-GSTT1 antibodies in serum samples close to the diagnostic biopsy of 7 patients with dnAIH; note that only IgG1 and IgG4 were present whereas IgG2 and IgG3 were absent. It is important to highlight that these are donor-specific antibodies.

GSTT1 antibodies persist (longest follow-up > 20 years) (unpublished results).

Impairment of Treg cells has been described in patients with classical AIH<sup>[57]</sup>. In the transplant setting, a similar role for Tregs in the development of dnAIH has been suggested. Kerkar and Yanni proposed that Treg function could be impaired in dnAIH since calcineurin

inhibitors reduce the production of IL-2, which is required for the survival and proliferation of Tregs<sup>[66]</sup>. In the same sense, a study by Arterbery *et al*<sup>[67]</sup> sustains that the Tregs of patients with dnAIH are functionally impaired and produce increased levels of proinflammatory cytokines.

On the other hand, important questions about dnAIH

have yet to be answered. One of the most intriguing aspects is why some patients do not develop a GSTT1-specific B cell response, as this is going to be critical to the prevention of PC-rich rejection. In our hands, the choice of tacrolimus instead of cyclosporine can be decisive in avoiding the humoral response<sup>[68]</sup>. However, there is no consensus among the scientific community on this matter. While some studies support the observation of tacrolimus as a protective factor<sup>[3-5,8,9,15-17,20,21]</sup>, others have shown that the use of tacrolimus seems to be a risk factor for dAIH<sup>[13,14,19,22-25]</sup>, therefore, this point remains controversial (Table 1).

## CONCLUSION

We are now closer than ever to clarification of the mechanisms leading to plasma cell-rich rejection. The demonstration of memory T cells specific for the GSTT1 antigen as well as B lymphocytes and GSTT1 antibody-producing plasma cells after GSTT1-mismatched liver transplants support the hypothesis in which both cell types are required to develop the immune response leading to PC-rich rejection. This chronic disease has a significant impact on survival of those patients that are not correctly diagnosed.

## REFERENCES

- Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O'Leary J, Randhawa PS, Feng S, Neil D, Colvin RB, McCaughan G, Fung JJ, Del Bello A, Reinholt FP, Haga H, Adeyi O, Czaja AJ, Schiano T, Fiel MI, Smith ML, Sebagh M, Tanigawa RY, Yilmaz F, Alexander G, Baiocchi L, Balasubramanian M, Batal I, Bhan AK, Bucuvalas J, Cerski CTS, Charlotte F, de Vera ME, ElMonayeri M, Fontes P, Furth EE, Gouw ASH, Hafezi-Bakhtiari S, Hart J, Honsova E, Ismail W, Itoh T, Jhala NC, Khettry U, Klintmalm GB, Knechtle S, Koshiha T, Kozlowski T, Lassman CR, Lerut J, Levitsky J, Licini L, Liotta R, Mazariegos G, Minervini MI, Misdragi J, Mohanakumar T, Mólne J, Nasser I, Neuberger J, O'Neil M, Pappo O, Petrovic L, Ruiz P, Sağol Ö, Sanchez Fueyo A, Sasatomi E, Shaked A, Shiller M, Shimizu T, Sis B, Sonzogni A, Stevenson HL, Thung SN, Tisone G, Tzsmandas AC, Wernerson A, Wu T, Zeevi A, Zen Y. 2016 Comprehensive Update of the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology: Introduction of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* 2016; **16**: 2816-2835 [PMID: 27273869 DOI: 10.1111/ajt.13909]
- Kerkar N, Hadzić N, Davies ET, Portmann B, Donaldson PT, Rela M, Heaton ND, Vergani D, Mieli-Vergani G. De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998; **351**: 409-413 [PMID: 9482295 DOI: 10.1016/S0140-6736(97)06478-7]
- Gupta P, Hart J, Millis JM, Cronin D, Brady L. De novo hepatitis with autoimmune antibodies and atypical histology: a rare cause of late graft dysfunction after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 2001; **71**: 664-668 [PMID: 11292299]
- Andries S, Casamayou L, Sempoux C, Burtel M, Reding R, Bernard Otte J, Buts JP, Sokal E. Posttransplant immune hepatitis in pediatric liver transplant recipients: incidence and maintenance therapy with azathioprine. *Transplantation* 2001; **72**: 267-272 [PMID: 11477351]
- Hernandez HM, Kovarik P, Whittington PF, Alonso EM. Autoimmune hepatitis as a late complication of liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; **32**: 131-136 [PMID: 11321380]
- Petz W, Sonzogni A, Bertani A, Spada M, Lucianetti A, Colledan M, Gridelli B. A cause of late graft dysfunction after pediatric liver transplantation: de novo autoimmune hepatitis. *Transplant Proc* 2002; **34**: 1958-1959 [PMID: 12176643 DOI: 10.1016/S0041-1345(02)03137-8]
- Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Sakurai T, Shirase T, Manabe T, Egawa H. De novo autoimmune hepatitis affecting allograft but not the native liver in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2003; **76**: 271-272 [PMID: 12865828 DOI: 10.1097/01.TP.0000072338.88465.59]
- Gibelli NE, Tannuri U, Mello ES, Cançado ER, Santos MM, Ayoub AA, Maksoud-Filho JG, Velhote MC, Silva MM, Pinho-Apezato ML, Maksoud JG. Successful treatment of de novo autoimmune hepatitis and cirrhosis after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant* 2006; **10**: 371-376 [PMID: 16677364 DOI: 10.1111/j.1399-3046.2005.00470.x]
- Evans HM, Kelly DA, McKiernan PJ, Hübscher S. Progressive histological damage in liver allografts following pediatric liver transplantation. *Hepatology* 2006; **43**: 1109-1117 [PMID: 16628633 DOI: 10.1002/hep.21152]
- Riva S, Sonzogni A, Bravi M, Bertani A, Alessio MG, Candusso M, Stroppa P, Melzi ML, Spada M, Gridelli B, Colledan M, Torre G. Late graft dysfunction and autoantibodies after liver transplantation in children: preliminary results of an Italian experience. *Liver Transpl* 2006; **12**: 573-577 [PMID: 16555335 DOI: 10.1002/lt.20673]
- Oya H, Sato Y, Yamamoto S, Kobayashi T, Watanabe T, Kokai H, Hatakeyama K. De novo autoimmune hepatitis after living donor liver transplantation in a 25-day-old newborn baby: a case report. *Transplant Proc* 2009; **41**: 433-434 [PMID: 19249573 DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.10.031]
- Cho JM, Kim KM, Oh SH, Lee YJ, Rhee KW, Yu E. De novo autoimmune hepatitis in Korean children after liver transplantation: a single institution's experience. *Transplant Proc* 2011; **43**: 2394-2396 [PMID: 21839275 DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.05.030]
- Pongpaibul A, Venick RS, McDiarmid SV, Lassman CR. Histopathology of de novo autoimmune hepatitis. *Liver Transpl* 2012; **18**: 811-818 [PMID: 22378542 DOI: 10.1002/lt.23422]
- Ekong UD, McKiernan P, Martinez M, Lobritto S, Kelly D, Ng VL, Alonso EM, Avitzur Y. Long-term outcomes of de novo autoimmune hepatitis in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2017; **21** [PMID: 28556542 DOI: 10.1111/ptr.12945]
- Jones DE, James OF, Portmann B, Burt AD, Williams R, Hudson M. Development of autoimmune hepatitis following liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1999; **30**: 53-57 [PMID: 10385638 DOI: 10.1002/hep.510300103]
- Heneghan MA, Portmann BC, Norris SM, Williams R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, O'Grady JG. Graft dysfunction mimicking autoimmune hepatitis following liver transplantation in adults. *Hepatology* 2001; **34**: 464-470 [PMID: 11526530 DOI: 10.1053/jhep.2001.26756]
- Salcedo M, Vaquero J, Bañares R, Rodríguez-Mahou M, Alvarez E, Vicario JL, Hernández-Albujar A, Tiscar JL, Rincón D, Alonso S, De Diego A, Clemente G. Response to steroids in de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Hepatology* 2002; **35**: 349-356 [PMID: 11826408 DOI: 10.1053/jhep.2002.31167]
- Aguilera I, Sousa JM, Gavilán F, Bernardos A, Wichmann I, Nuñez-Roldán A. Glutathione S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2004; **10**: 1166-1172 [PMID: 15350010 DOI: 10.1002/lt.20209]
- Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Hayashino Y, Sakurai T, Minamiguchi S, Tanaka K, Manabe T. Outcome and risk factors of de novo autoimmune hepatitis in living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2004; **78**: 128-135 [PMID: 15257051]
- Tsuji H, Hiramatsu K, Minato H, Kaneko S, Nakanuma Y. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation with de novo autoimmune hepatitis in the allograft and leftover primary biliary cirrhosis in the native liver. *Semin Liver Dis* 2005; **25**: 371-377 [PMID: 16143952 DOI: 10.1055/s-2005-916328]
- Rodríguez-Díaz Y, Reyes-Rodríguez R, Dorta-Francisco MC,



- Aguilera I, Perera-Molinero A, Moneva-Arce E, Aviles-Ruiz JF. De novo autoimmune hepatitis following liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Transplant Proc* 2006; **38**: 1467-1470 [PMID: 16797335 DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.03.071]
- 22 Yoshizawa K, Shirakawa H, Ichijo T, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Imagawa E, Matsuda K, Hidaka E, Sano K, Nakazawa Y, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S, Ota M, Nakano M. De novo autoimmune hepatitis following living-donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis. *Clin Transplant* 2008; **22**: 385-390 [PMID: 18190552 DOI: 10.1111/j.1399-0012.2007.00787.x]
- 23 Fiel MI, Agarwal K, Stanca C, Elhajj N, Kontorinis N, Thung SN, Schiano TD. Posttransplant plasma cell hepatitis (de novo autoimmune hepatitis) is a variant of rejection and may lead to a negative outcome in patients with hepatitis C virus. *Liver Transpl* 2008; **14**: 861-871 [PMID: 18508382 DOI: 10.1002/lt.21447]
- 24 Zhang Y, Wang B, Wang T. De novo autoimmune hepatitis with centrilobular necrosis following liver transplantation for primary biliary cirrhosis: a case report. *Transplant Proc* 2010; **42**: 3854-3857 [PMID: 21094869 DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.08.062]
- 25 Montano-Loza AJ, Vargas-Vorackova F, Ma M, Bain VG, Burak K, Kumar T, Mason AL. Incidence and risk factors associated with de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Liver Int* 2012; **32**: 1426-1433 [PMID: 22712495 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02832.x]
- 26 Banff Working Group., Demetris AJ, Adeyi O, Bellamy CO, Clouston A, Charlotte F, Czaja A, Daskal I, El-Monayeri MS, Fontes P, Fung J, Gridelli B, Guido M, Haga H, Hart J, Honsova E, Hubscher S, Itoh T, Jhala N, Jungmann P, Khettry U, Lassman C, Ligato S, Lunz JG 3rd, Marcos A, Minervini MI, Mölne J, Nalesnik M, Nasser I, Neil D, Ochoa E, Pappo O, Randhawa P, Reinholt FP, Ruiz P, Sebach M, Spada M, Sonzogni A, Tsamandas AC, Wemerson A, Wu T, Yilmaz F. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. *Hepatology* 2006; **44**: 489-501 [PMID: 16871565 DOI: 10.1002/hep.21280]
- 27 Shaikh OS, Demetris AJ. Idiopathic posttransplantation hepatitis? *Liver Transpl* 2007; **13**: 943-946 [PMID: 17600346 DOI: 10.1002/lt.21202]
- 28 Schreuder TC, Hübscher SG, Neuberger J. Autoimmune liver diseases and recurrence after orthotopic liver transplantation: what have we learned so far? *Transpl Int* 2009; **22**: 144-152 [PMID: 18662365 DOI: 10.1111/j.1432-2277.2008.00729]
- 29 Hübscher SG. Antibody-mediated rejection in the liver allograft. *Curr Opin Organ Transplant* 2012; **17**: 280-286 [PMID: 22569512 DOI: 10.1097/MOT.0b013e3182353584c]
- 30 Hübscher SG. What is the long-term outcome of the liver allograft? *J Hepatol* 2011; **55**: 702-717 [PMID: 21426919 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.03.005]
- 31 Sebach M, Castillo-Rama M, Azoulay D, Coilly A, Delvart V, Allard MA, Dos Santos A, Johanet C, Roque-Afonso AM, Saliba F, Duclos-Vallée JC, Samuel D, Demetris AJ. Histologic findings predictive of a diagnosis of de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation in adults. *Transplantation* 2013; **96**: 670-678 [PMID: 23982338 DOI: 10.1097/TP.0b013e31829eda7f]
- 32 Vukotic R, Vitale G, D'Errico-Grigioni A, Muratori L, Andreone P. De novo autoimmune hepatitis in liver transplant: State-of-the-art review. *World J Gastroenterol* 2016; **22**: 2906-2914 [PMID: 26973387 DOI: 10.3748/wjg.v22.i10.2906]
- 33 Nagai S, Ito M, Kamei H, Nakamura T, Ando H, Kiuchi T. Indirect immunohistochemical evaluation of graft fibrosis and interface hepatitis after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant* 2010; **14**: 342-350 [PMID: 19744282 DOI: 10.1111/j.1399-3046.2009.01234.x]
- 34 Demetris AJ, Sebach M. Plasma cell hepatitis in liver allografts: Variant of rejection or autoimmune hepatitis? *Liver Transpl* 2008; **14**: 750-755 [PMID: 18508366 DOI: 10.1002/lt.21518]
- 35 Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Enecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nicleleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; **8**: 753-760 [PMID: 18294345 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x]
- 36 Aguilera I, Sousa JM, Gavilan F, Gomez L, Alvarez-Márquez A, Núñez-Roldán A. Complement component 4d immunostaining in liver allografts of patients with de novo immune hepatitis. *Liver Transpl* 2011; **17**: 779-788 [PMID: 21425430 DOI: 10.1002/lt.22302]
- 37 Trivedi A, Schiano TD, Ward SC, Thung SN, Fiel MI, Levitsky J. C4d is present in portal venules in plasma cell hepatitis and may also be used as a predictor for its development. *Hepatology* 2014; **60**: 457A
- 38 Deshpande V, Zen Y, Chan JK, Yi EE, Sato Y, Yoshino T, Klöppel G, Heathcote JG, Khosroshahi A, Ferry JA, Aalberse RC, Bloch DB, Brugge WR, Bateman AC, Carruthers MN, Chari ST, Cheuk W, Cornell LD, Fernandez-Del Castillo C, Forcione DG, Hamilos DL, Kamisawa T, Kasashima S, Kawa S, Kawano M, Lauwers GY, Masaki Y, Nakanuma Y, Notohara K, Okazaki K, Ryu JK, Saeki T, Sahani DV, Smyrk TC, Stone JR, Takahira M, Webster GJ, Yamamoto M, Zamboni G, Umehara H, Stone JH. Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease. *Mod Pathol* 2012; **25**: 1181-1192 [PMID: 22596100 DOI: 10.1038/modpathol.2012.72]
- 39 Tamaro G, Sonzogni A, Torre G. Monitoring "de novo" autoimmune hepatitis (LKM positive) by serum type-IV collagen after liver transplant: a paediatric case. *Clin Chim Acta* 2001; **310**: 25-29 [PMID: 11485751 DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00509-5]
- 40 Tripathi D, Neuberger J. Autoimmune hepatitis and liver transplantation: indications, results, and management of recurrent disease. *Semin Liver Dis* 2009; **29**: 286-296 [PMID: 19676001 DOI: 10.1055/s-0029-1233531]
- 41 Wichmann I, Aguilera I, Sousa JM, Bernardos A, García Núñez EJ, Vigil E, Magariño R, Magariño I, Torres A, Núñez-Roldán A. Antibodies against glutathione S-transferase T1 in non-solid organ transplanted patients. *Transfusion* 2006; **46**: 1505-1509 [PMID: 16965576 DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00938.x]
- 42 Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, García-Lozano JR, Núñez-Roldán A. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001; **126**: 535-539 [PMID: 11737073]
- 43 Rodríguez-Mahou M, Salcedo M, Fernandez-Cruz E, Tiscar JL, Bañares R, Clemente G, Vicario JL, Alvarez E, Rodríguez-Sainz C. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with GSTT1 null genotype as prognostic marker: long-term follow-up after liver transplantation. *Transplantation* 2007; **83**: 1126-1129 [PMID: 17452905 DOI: 10.1097/01.tp.0000259963.47350.da]
- 44 Czaja AJ. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2012; **57**: 2248-2266 [PMID: 22562533 DOI: 10.1007/s10620-012-2179-3]
- 45 Bellamy CO. Complement C4d immunohistochemistry in the assessment of liver allograft biopsy samples: applications and pitfalls. *Liver Transpl* 2011; **17**: 747-750 [PMID: 21542127]
- 46 Haga H, Egawa H, Fujimoto Y, Ueda M, Miyagawa-Hayashino A, Sakurai T, Okuno T, Koyanagi I, Takada Y, Manabe T. Acute humoral rejection and C4d immunostaining in ABO blood type-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; **12**: 457-464 [PMID: 16498648 DOI: 10.1002/lt.20652]
- 47 Kozłowski T, Rubinas T, Nicleleit V, Woosley J, Schmitz J, Collins D, Hayashi P, Passannante A, Andreoni K. Liver allograft antibody-mediated rejection with demonstration of sinusoidal C4d staining and circulating donor-specific antibodies. *Liver Transpl* 2011; **17**: 357-368 [PMID: 21445918 DOI: 10.1002/lt.22233]
- 48 Dumortier J, Scoazec JY, Guillaud O, Hequet O, Hervieu V, Boillot O. Treatment of severe refractory de novo auto-immune hepatitis after liver transplantation with plasmapheresis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; **39**: e83-e85 [PMID: 26070570 DOI: 10.1016/j.clinre.2015.04.003]

- 49 **Wozniak LJ**, Hickey MJ, Venick RS, Vargas JH, Farmer DG, Busuttill RW, McDiarmid SV, Reed EF. Donor-specific HLA Antibodies Are Associated With Late Allograft Dysfunction After Pediatric Liver Transplantation. *Transplantation* 2015; **99**: 1416-1422 [PMID: 26038872 DOI: 10.1097/TP.0000000000000796]
- 50 **Ward SC**, Schiano TD, Thung SN, Fiel MI. Plasma cell hepatitis in hepatitis C virus patients post-liver transplantation: case-control study showing poor outcome and predictive features in the liver explant. *Liver Transpl* 2009; **15**: 1826-1833 [PMID: 19938116 DOI: 10.1002/lt.21949]
- 51 **Neuberger J**. An update on liver transplantation: A critical review. *J Autoimmun* 2016; **66**: 51-59 [PMID: 26350881 DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.021]
- 52 **Mack CL**. What Causes Biliary Atresia? Unique Aspects of the Neonatal Immune System Provide Clues to Disease Pathogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2015; **1**: 267-274 [PMID: 26090510 DOI: 10.1016/j.jcmgh.2015.04.001]
- 53 **Alvarez F**. Is biliary atresia an immune mediated disease? *J Hepatol* 2013; **59**: 648-650 [PMID: 23792027 DOI: 10.1016/j.jhep.2013.06.006]
- 54 **Pang SY**, Dai YM, Zhang RZ, Chen YH, Peng XF, Fu J, Chen ZK, Liu YF, Yang LY, Wen Z, Yu JK, Liu HY. Autoimmune liver disease-related autoantibodies in patients with biliary atresia. *World J Gastroenterol* 2018; **24**: 387-396 [PMID: 29391761 DOI: 10.3748/wjg.v24.i3.387]
- 55 **Muraji T**, Ohtani H, Ieiri S. Unique manifestations of biliary atresia provide new immunological insight into its etiopathogenesis. *Pediatr Surg Int* 2017; **33**: 1249-1253 [PMID: 29022092 DOI: 10.1007/s00383-017-4155-7]
- 56 **Martínez-Bravo MJ**, Sánchez B, Sousa JM, Acevedo MJ, Gómez-Bravo MA, Núñez-Roldán A, Aguilera I. T-cell allorecognition of donor glutathione S-transferase T1 in plasma cell-rich rejection. *World J Hepatol* 2017; **9**: 1115-1124 [PMID: 29026463 DOI: 10.4254/wjh.v9.i27.1115]
- 57 **Vergani D**, Mieli-Vergani G. The impact of autoimmunity on hepatocytes. *Semin Liver Dis* 2007; **27**: 140-151 [PMID: 17520514 DOI: 10.1055/s-2007-979467]
- 58 **Aguado-Domínguez E**, Gómez L, Sousa JM, Gómez-Bravo MA, Núñez-Roldán A, Aguilera I. Identification of the cellular components involved in de novo immune hepatitis: a quantitative immunohistochemical analysis. *J Transl Med* 2018; **16**: 62 [PMID: 29534755 DOI: 10.1186/s12967-018-1440-8]
- 59 **Eguchi S**, Takatsuki M, Hidaka M, Tajima Y, Zen Y, Nakanuma Y, Kanematsu T. De novo autoimmune hepatitis after living donor liver transplantation is unlikely to be related to immunoglobulin subtype 4-related immune disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; **23**: e165-e169 [PMID: 18505414 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05347.x]
- 60 **Castillo-Rama M**, Sebah M, Sasatomi E, Randhawa P, Isse K, Salgarkar AD, Ruppert K, Humar A, Demetris AJ. "Plasma cell hepatitis" in liver allografts: identification and characterization of an IgG4-rich cohort. *Am J Transplant* 2013; **13**: 2966-2977 [PMID: 24011021 DOI: 10.1111/ajt.12413]
- 61 **Aguilera I**, Martínez-Bravo MJ, Sousa JM, Pozo-Borrego AJ, Núñez-Roldán A. IgG subclass profile among anti-Glutathione S-transferase T1 antibodies in post-transplant de novo immune hepatitis. *Clin Transplant* 2016; **30**: 210-217 [PMID: 26663521 DOI: 10.1111/ctr.12675]
- 62 **Ekong UD**, Mathew J, Melin-Aldana H, Wang D, Alonso EM. Successful resolution of inflammation and increased regulatory T cells in sirolimus-treated post-transplant allograft hepatitis. *Pediatr Transplant* 2012; **16**: 165-175 [PMID: 22360400 DOI: 10.1111/j.1399-3046.2012.01648.x]
- 63 **Edmunds C**, Ekong UD. Autoimmune Liver Disease Post-Liver Transplantation: A Summary and Proposed Areas for Future Research. *Transplantation* 2016; **100**: 515-524 [PMID: 26447505 DOI: 10.1097/TP.0000000000000922]
- 64 **Martínez-Bravo MJ**, Calderón-Cabrera C, Márquez-Malaver FJ, Rodríguez N, Guijarro M, Espigado I, Núñez-Roldán A, Pérez-Simón JA, Aguilera I. Mismatch on glutathione S-transferase T1 increases the risk of graft-versus-host disease and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 1356-1362 [PMID: 24844856 DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.05.008]
- 65 **Aguado-Domínguez E**, Sousa JM, Perez-Simon JA, Aguilera I. Clinical association of anti-glutathione S-transferase T1 antibodies and de novo immune hepatitis after hematopoietic cell transplantation. *Dig Liver Dis* 2018; **50**: 418-419 [PMID: 29409781 DOI: 10.1016/j.dld.2017.12.033]
- 66 **Kerkar N**, Yanni G. 'De novo' and 'recurrent' autoimmune hepatitis after liver transplantation: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2016; **66**: 17-24 [PMID: 26377632 DOI: 10.1016/j.jaut.2015.08.017]
- 67 **Arterbery AS**, Osafo-Addo A, Avitzur Y, Ciarleglio M, Deng Y, Lobritto SJ, Martinez M, Hafler DA, Kleinewietfeld M, Ekong UD. Production of Proinflammatory Cytokines by Monocytes in Liver-Transplanted Recipients with De Novo Autoimmune Hepatitis Is Enhanced and Induces TH1-like Regulatory T Cells. *J Immunol* 2016; **196**: 4040-4051 [PMID: 27183637 DOI: 10.4049/jimmunol.150227]
- 68 **Aguilera I**, Sousa JM, Praena JM, Gómez-Bravo MA, Núñez-Roldán A. Choice of calcineurin inhibitor may influence the development of de novo immune hepatitis associated with anti-GSTT1 antibodies after liver transplantation. *Clin Transplant* 2011; **25**: 207-212 [PMID: 20236132 DOI: 10.1111/j.1399-0012.2010.01221.x]

**P- Reviewer:** Hann HW, Kamal SA, Mendez-Sanchez N  
**S- Editor:** Gong ZM **L- Editor:** A **E- Editor:** Huang Y





#### **Publicación 4**

4. “*Clinical association of anti-glutathione S-transferase T1 antibodies and de novo immune hepatitis after hematopoietic cell transplantation*”

Autores: Elena Aguado Domínguez, José Manuel Sousa, José Antonio Pérez Simón e Isabel Aguilera.

*Digestive and Liver Disease* 2018; 50(4):418-419



\* Corresponding author at: Miraca Life Sciences Research Institute, 6655 N. MacArthur Blvd., Irving, TX 75039, USA.

E-mail address: [rmgenta@bcm.edu](mailto:rmgenta@bcm.edu) (R.M. Genta)

18 December 2017

26 December 2017

29 December 2017

<https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.12.034>

### Clinical association of anti-glutathione S-transferase T1 antibodies and *de novo* immune hepatitis after hematopoietic cell transplantation

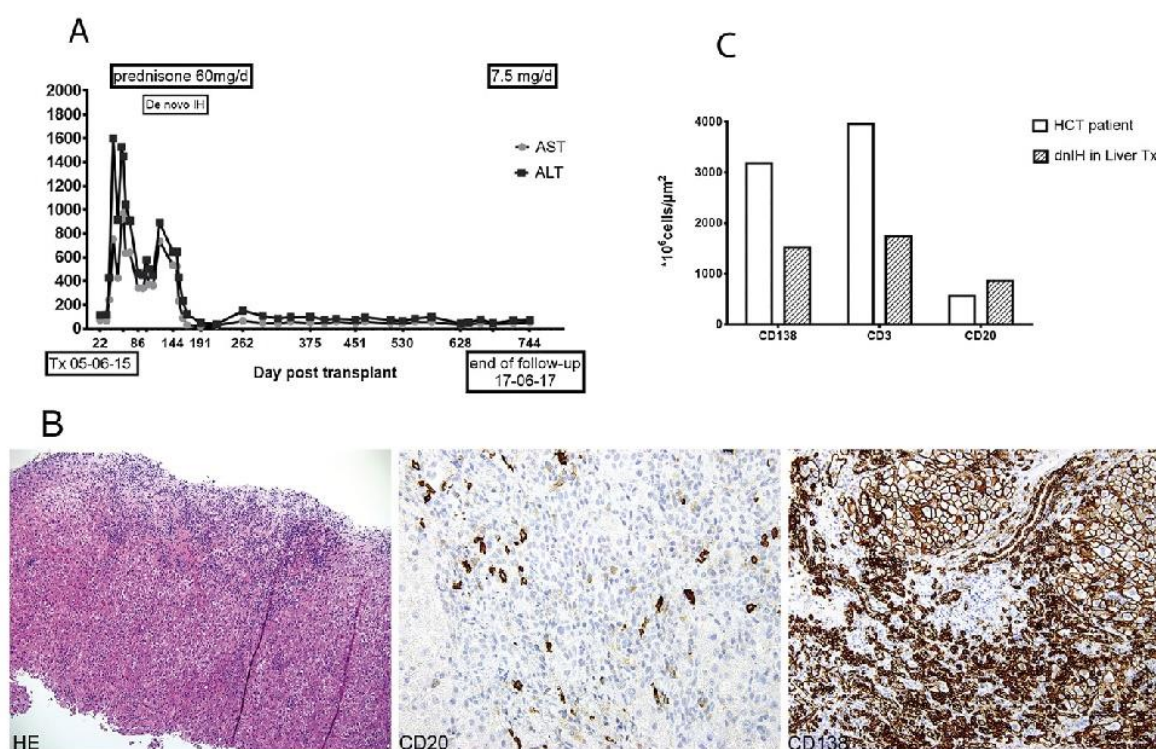
Dear Editor,

Autoimmune hepatitis-like (AIH) is an uncommon but well recognized complication after hematopoietic cell transplantation (HCT) [1–4]. A similar phenomenon termed *de novo* AIH was described for the first time in 1998 in patients that have undergone liver transplantation [5]. We found that all patients diagnosed with *de novo* AIH in our institution produced anti-glutathione S-transferase T1 (GSTT1) antibodies of the IgG class as a result of a genetic mismatch between a donor, that carries the wild type allele, and a recipient that lacks any copy of this gene [6,7]. Deletion of

the GSTT1 gene, resulting in a complete lack of protein expression, occurs in 20% of the Caucasian population [8]. We have analyzed the effect of the GSTT1 mismatch after HCT and have shown that the combination GSTT1 null donor/positive recipient, constitutes a risk factor for acute and chronic hepatic GvHD [9]. In this study, we investigated the immune response in a HCT transplanted patient who developed *de novo* AIH indistinguishable from that observed after a liver transplant.

A 54-year-old woman diagnosed with a kappa multiple myeloma underwent a reduced intensity conditioning allogeneic HCT from her HLA-identical sister on June 2015. Bortezomib plus sirolimus and tacrolimus were used as GvHD prophylaxis. Engraftment of neutrophils and platelets occurred on days +14 and +12 post-transplantation, respectively. Her hepatic enzymes began to increase on day +40 and reached a peak on day +54: ALT 1448 IU/l, AST 968 IU/l (Fig. 1A), total bilirubin was 3.06 mg/dl, serum gammaglobulin level was 3283 mg/dl and kappa light chain value was 948 mg/dl. A liver biopsy performed on day +160 showed histological features consistent with *de novo* AIH. PCR assays ruled out viral infections. Serum biomarkers of autoimmune hepatitis (ANA, AMA, SMA, LKM) were also negative but GSTT1 antibodies were detected at a titer of 1/320 on day +160. The allelic combination was confirmed as GSTT1 null donor/positive recipient. She was treated with prednisone at 60 mg/day with a good response and a quick normalization of the transaminase and IgG levels (peak 8019 mg/dl). Prednisone was gradually reduced until reaching the actual dose of 7.5 mg/day.

Several cell types were studied in the diagnostic biopsy by immunohistochemistry and a stereology evaluation was done using the New Computer-Assisted System Technology (newCAST) from Visiopharm® that permits to quantify the number of cells per



**Fig. 1.** (A) Follow-up of the hepatic function in the patient after HCT. Alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) are maintained at normal levels after *de novo* IH diagnosis and steroid treatment. (B) Diagnostic biopsy of *de novo* immune hepatitis stained with hematoxylin eosin (left), immunostained with anti-CD20 antibodies (center) and CD138 (right). (C) After quantification in the diagnostic biopsy, the number of CD138<sup>+</sup> plasma cells, CD3<sup>+</sup> T lymphocytes and CD20<sup>+</sup> B lymphocytes, were compared with the mean value obtained in a group of patients with *de novo* IH after liver transplantation.

area. The major components of the infiltrates were T lymphocytes and plasma cells (Fig. 2B). The number of CD3<sup>+</sup> and CD138<sup>+</sup> cells was 2-fold higher than that of *de novo* AIH after liver transplantation, while CD20<sup>+</sup> B lymphocytes were similar in both groups (Fig. 2C).

We report the first case of histologically proven, GSTT1-mediated *de novo* IH after allogeneic HCT. From the immunological point of view, the importance of this finding lies in the demonstration of an identical immune response in two completely different transplant settings, solid organ and HCT. The use of the term “plasma cell-rich rejection” instead of *de novo* AIH, recently suggested by the Banff Working Group on Liver Allograft Pathology is clearly supporting our understanding of the mechanisms leading to this specific type of rejection [10].

In summary, our study suggests that a number of liver GvHD could be misdiagnosed in the absence of a biopsy and, even when a biopsy is available, the distinction between auto-/alloimmune hepatitis and “hepatic” GvHD could be difficult to achieve. Detection of anti-GSTT1 antibodies should be considered for a correct diagnosis in case of GSTT1 mismatch.

#### Conflict of interest

None declared.

#### Funding sources

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy, Instituto de Salud Carlos III, grant11/857, and the Andalusian government, Proyecto de Excelencia CTS-7846. IA is a senior researcher from the Nicolás Monardes Program.

#### References

- [1] Ogose T, Watanabe T, Suzuya H, Kaneko M, Onishi T, Watanabe H, et al. Autoimmune hepatitis following allogeneic PBSCT from an HLA-matched sibling. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:829–32.
- [2] Mori M, Tabata S, Hashimoto H, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, et al. Successful living donor liver transplantation for severe hepatic GVHD histologically resembling autoimmune hepatitis after bone marrow transplantation from the same sibling donor. *Transpl Int* 2010;23:e1–4.
- [3] Koyama D, Ito M, Yokihata E, Watakabe K, Onodera K, Goto T, et al. Autoimmune-like hepatitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: humoral hepatic GvHD. *Bone Marrow Transplant* 2017;52:151–3.
- [4] Baniak NM, Kanthan R. Autoimmune-like hepatitis: a “hepatic” manifestation of chronic graft versus host disease in post-stem cell transplant. *Int J Surg Pathol* 2016;24:146–52.
- [5] Kerkar N, Hadzic N, Davies ET, Portmann B, Donaldson PT, Rela M, et al. De novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998;351:409–13.
- [6] Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, Garcia-Lozano JR, et al. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001;126:535–9.
- [7] Aguilera I, Sousa JM, Gavilán F, Bernardos A, Wichmann I, Nuñez-Roldán A. Glutathione S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transplant* 2004;10:1166–72.
- [8] Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000;463:247–83.
- [9] Martínez-Bravo MJ, Calderón-Cabrera C, Márquez-Malaver FJ, Rodríguez N, Guijarro M, Espigado I, et al. Mismatch on glutathione S-transferase T1 increases the risk of graft-versus-host disease and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:1356–62.
- [10] Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, O’Leary J, Randhawa PS, Feng S, et al. Comprehensive update of the Banff working group on liver allograft pathology: introduction of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2016;16:2816–35.

Elena Aguado-Dominguez  
Immunology, Institut of Biomedicine of Seville (IBIS),  
University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

Jose Manuel Sousa  
Digestive and Liver Diseases, Institut of Biomedicine  
of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío,  
Seville, Spain

Jose Antonio Perez-Simon  
Hematology, Institut of Biomedicine of Seville (IBIS),  
University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

Isabel Aguilera\*  
Immunology, Institut of Biomedicine of Seville (IBIS),  
University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

\* Corresponding author at: Department of  
Immunology, Instituto de Biomedicina de Sevilla  
(IBIS), Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Seville,  
Spain.  
E-mail address: [iaquilera-ibis@us.es](mailto:iaquilera-ibis@us.es) (I. Aguilera)

26 December 2017

29 December 2017

<https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.12.033>





## Resumen de Resultados y Discusión

El trabajo de esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la composición de los infiltrados inflamatorios mediante técnicas avanzadas en microscopía en diferentes situaciones relacionadas con el rechazo en el trasplante.

Para ello, las preguntas generales que tratamos de responder fueron las siguientes:

1. ¿Cómo son los infiltrados inflamatorios en diferentes categorías de rechazo de Banff en biopsias de trasplante renal? [Publicación 1]

Para abordar este objetivo, hemos analizado una cohorte de pacientes trasplantados de riñón en los que hemos estudiado la composición de diferentes células relacionadas con el rechazo inmunológico en biopsias con diferentes diagnósticos según los criterios de Banff.

2. ¿Qué componentes celulares están involucrados en el desarrollo de la hepatitis inmune *de novo* en el trasplante hepático bajo la situación de incompatibilidad en GSTT1? [Publicaciones 2 y 3]

Para desarrollar este punto, hemos estudiado los componentes celulares presentes en aloinjertos hepáticos de una cohorte de pacientes con diagnóstico de HIdn tras ser sometidos a un trasplante de hígado, cuantificando la presencia de células plasmáticas y dibujando un perfil celular relacionado con la respuesta humoral. Además, hemos revisado las últimas aportaciones en el estudio de esta entidad y en la consideración de verdadero rechazo mediado por anticuerpos y rico en células plasmáticas.

3. ¿Puede la incompatibilidad GSTT1 originar una respuesta de daño al hígado similar a la hepatitis inmune *de novo* tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos? [Publicación 4]

Por último, hemos descrito por primera vez el desarrollo de HIdn en el contexto del TPH en una paciente cuya donante era su hermana, idéntica para el genotipo HLA, pero incompatible para GSTT1, bajo la situación de donante nulo/receptor positivo, y que previamente había experimentado episodios de sensibilización tras varios embarazos.

Los conocimientos actuales sobre el rechazo del injerto han cambiado radicalmente desde que se asumía su clasificación simplificada en rechazo agudo y crónico, hasta las más recientes revisiones donde se establecen las categorías diagnósticas y últimos hallazgos moleculares descritos <sup>37,38,41</sup>.

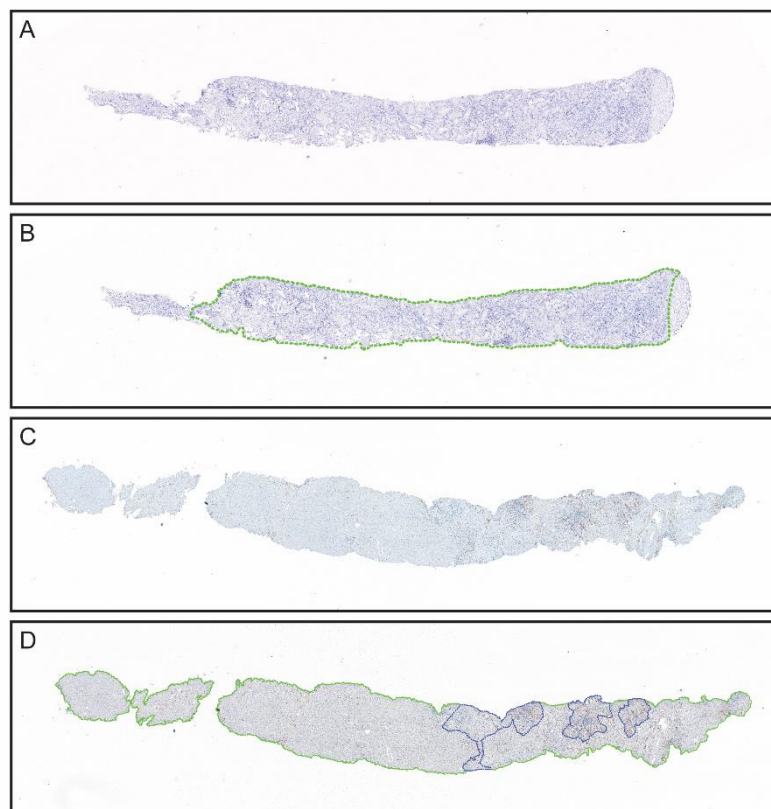
Como hemos comentado previamente, la técnica *goldstandard* para el seguimiento del trasplante es la realización de una biopsia. El estudio de los hallazgos histológicos también ha evolucionado adquiriendo cada vez más relevancia diagnóstica. Por ejemplo, hasta hace poco, los infiltrados inflamatorios observados en zonas atrofiadas de una biopsia renal parecían no tener especial relevancia clínica y sin embargo, recientes estudios apuntan a un potente valor pronóstico respecto al riesgo de disfunción del injerto<sup>60</sup> y ha llevado a que Banff lo incluya y denomine como i-IFTA e i-total, criterios que tienen en cuenta la inflamación en esta zona de fibrosis intersticial y atrofia tubular y en la zona no atrofiada de la biopsia<sup>37</sup>. Actualmente el análisis fundamental que se realiza a la biopsia consiste en un estudio morfológico e histológico basado en los criterios diagnósticos de Banff, pero generalmente sin profundizar en qué tipos celulares están infiltrando el tejido. Del mismo modo se podría en el futuro incluir el estudio y la identificación de los tipos celulares que están presentes y pueden representar panoramas de respuesta inmune muy diferentes. Ya hay estudios que apuntan a que la inflamación en el aloinjerto es un indicador del futuro deterioro y fallo del órgano trasplantado<sup>16,60</sup>.

En nuestro trabajo y siempre que ha sido posible, se han identificado en las muestras de tejido un extenso número de tipos celulares mediante marcadores específicos como son: CD68, CD3, CD4, CD8, CD20, CD138, CD56, FoxP3, pSTAT1, cMAF o IgG4. Es importante tener en cuenta que nuestro estudio se encuentra limitado por el número de muestras de tejido de las que se tiene disponibilidad. Hemos trabajado con material biopsiado parafinado procedente de pacientes trasplantados en nuestro hospital gracias al Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz, que gestiona y supervisa la transacción de muestras humanas para la investigación, y contando con el visto bueno del Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío, que autoriza su uso para el desarrollo del proyecto de esta tesis doctoral. La realización de estas biopsias fue siempre indicada por sospecha de disfunción del injerto, no fueron en ningún caso tomadas con propósito de realizar este estudio de investigación y han sido procesadas, examinadas y sometidas a otras técnicas para la emisión del diagnóstico pertinente en el Servicio de Anatomía Patológica del centro.

Para el abordaje principal de nuestro proyecto, hemos utilizado una técnica que emplea microscopía, análisis de imagen, principios de geometría y estadística, basada en la estereología. La estereología es un método morfométrico que fundamentalmente emplea

cálculos para interpretar bi- y tridimensionalmente datos cuantitativos de secciones planas de tejido. Hasta nuestro conocimiento, nuestros trabajos son las primeras aportaciones que existen sobre la estereología aplicada al estudio del infiltrado celular del tejido trasplantado. Con esta herramienta, se realizan estimaciones cuantitativas mediante un muestreo sistemático en la zona de tejido con interés clínico, completamente al azar y eliminando plenamente el sesgo del observador, por el que finalmente obtenemos un dato cuantitativo de número de células por superficie de tejido <sup>61</sup>.

La gran mayoría de trabajos que abordan esta aproximación, emplean métodos observacionales semicuantitativos que no son completamente objetivos ni no sesgados <sup>62,63</sup> y sólo algunos trabajos recientes comienzan a emplear otras plataformas de análisis de imágenes digitalizadas, lo que introduce nuevas y útiles herramientas para el apoyo al diagnóstico <sup>62,64</sup>. En nuestro proyecto, tras captar una súper-imagen completa de la biopsia, las zonas de interés clínico para la cuantificación celular son seleccionadas gracias a herramientas de análisis de imagen. En tejido renal se selecciona la zona de corteza, excluyendo médula y otras áreas no relevantes clínicamente, y en el hepático la zona de parénquima incluyendo las zonas portales. Las diferentes regiones de interés (ROI) señalan las zonas a analizar con línea punteada (Figura 13). Se cuantifica en un 30% del ROI, porcentaje que muestra una fiabilidad estadística suficiente para obtener unos resultados numéricos de cuantificación de células/mm<sup>2</sup> consistentes <sup>61</sup>. De esta manera, incrementamos también la precisión para disminuir la variabilidad que en ocasiones ya existe entre secciones de tejido, entre bloques de biopsias, entre observadores <sup>65</sup>, etc. Mediante este novedoso abordaje, hemos aportado valiosa información de las células que conforman los infiltrados inflamatorios presentes en aloinjertos renales (objetivo 1), en aloinjertos hepáticos (objetivo 2) y en tejido hepático en el TPH (objetivo 3).

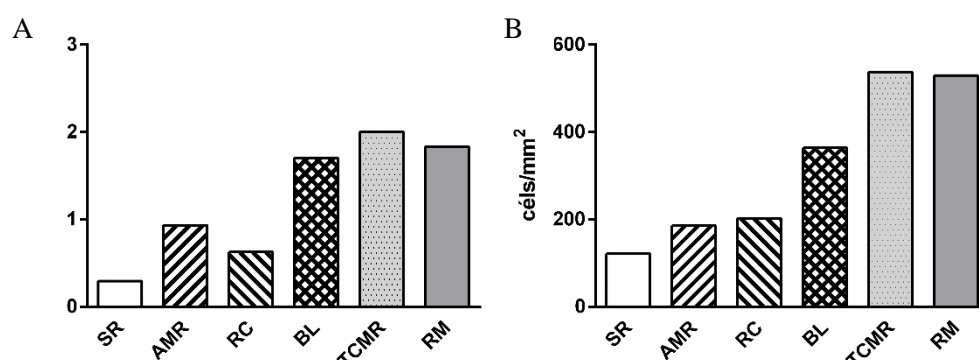


**Figura 13.** Súper-imagen de biopsia renal (A), ROI en biopsia renal marcado en verde (B), súper-imagen en biopsia hepática (C), ROI en biopsia hepática marcando parénquima hepático en verde y zonas portales en azul (D).

Otros autores han descrito la presencia de algunos tipos celulares como linfocitos y macrófagos en biopsias de pacientes bajo un episodio de AMR <sup>59,64</sup>, en el contexto de la GP del trasplante renal <sup>57</sup>, o relacionados con una peor función futura del aloinjerto <sup>62</sup>. Nosotros hemos estudiado una gran variedad de tipos celulares que componen los infiltrados y observamos diferencias respecto a la inflamación total en diferentes diagnósticos como RMA, cambios *borderline*, TCMR, rechazos mixtos que tienen participación de ambos componentes humoral y celular, así como en biopsias que no muestran signos histológicos de rechazo. Además hemos observado que existen diferentes tipos celulares que aparecen significativamente más en los infiltrados de unos tipos de rechazos renales que en otros. En el caso de biopsias *borderline*, células como linfocitos B, linfocitos T tanto CD4, CD8, como T reguladoras y macrófagos muestran diferencias estadísticamente significativas con otros diagnósticos. Es más, los altos

niveles de macrófagos M1 parecen ser una característica específica de esta entidad, lo que abre una línea aún por estudiar.

Si comparamos la relación existente entre la *i* categorizada por Banff en nuestra cohorte de biopsias de trasplante renal bajo diferentes situaciones de rechazo con nuestra cuantificación exhaustiva, vemos una muy buena correlación. Incluso podríamos apuntar a una leve infraestimación de la inflamación que presentan algunas biopsias con criterios de RC y mixto según el nivel en la escala de Banff asignado (Figura 14).

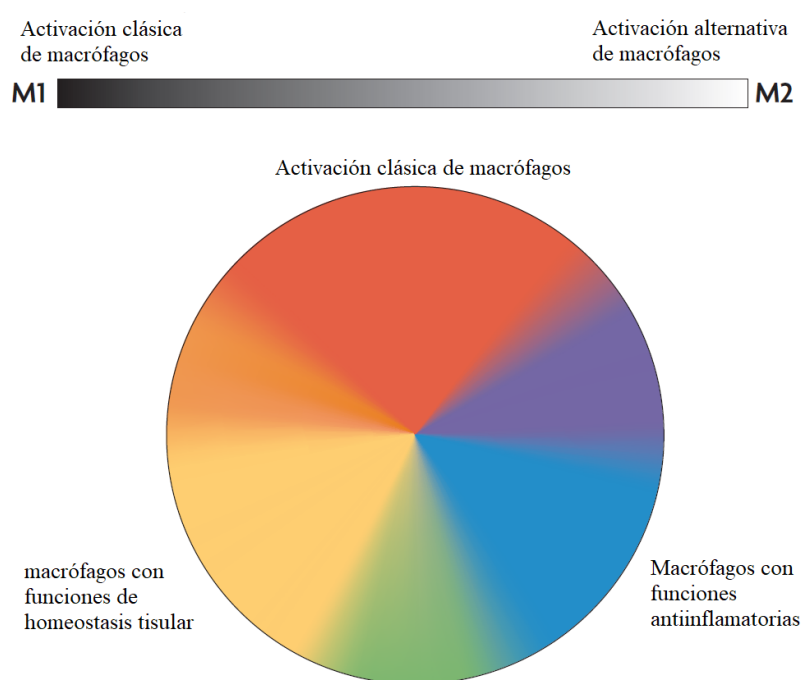


**Figura 14.** Inflamación medida en biopsias sin rechazo (SR) y en diferentes situaciones de rechazo: rechazo mediado por anticuerpos (AMR), rechazo crónico (RC), cambios *borderline* (BL), rechazo mediado por células T (TCMR) y rechazo mixto (RM), según la *i* de Banff (A) y según el protocolo de cuantificación empleado en nuestro estudio (B).

El papel de los macrófagos ha sido estudiado por algunos autores como Magil y colaboradores, que han remarcado su relevancia en el rechazo del trasplante renal. Los macrófagos son reclutados al tejido inflamado y ejercen su papel efector en el daño tisular, además de actuar como células presentadoras de antígenos, y se relacionan con un peor pronóstico <sup>66</sup>. Sin embargo, recientes estudios han profundizado en el papel que adquieren estas células en diferentes contextos.

Los macrófagos son células cuyo papel principal lo desarrollan en la denominada inmunidad innata, aunque también tienen un papel relevante en la inmunidad adaptativa. En un modelo de ratón, se ha demostrado que células NK y macrófagos reconocen y rechazan células alogénicas, adquiriendo un papel más importante en la aloinmunidad de lo que se les atribuía <sup>67</sup>. Nuestros resultados también sugieren que los macrófagos pueden tener un papel relevante en distintos tipos de rechazo y su identificación y cuantificación en aloinjertos renales nos permiten diferenciar distintos grupos de rechazo cuando

observamos tanto todos los macrófagos identificados, como poblaciones no polarizadas y polarizadas a M1 o M2. Entre los grupos de AMR y BL hay diferencias muy significativas en macrófagos M1 y entre los grupos CR y MR en macrófagos M2. Además de sus funciones en la inflamación, fagocitosis y presentación antigénica, los macrófagos también adquieren funciones diferentes como consecuencia de cambios en el entorno. Este tipo celular, por tanto, presenta heterogeneidad y plasticidad dependiendo del microambiente y adquieren diferentes fenotipos que conforman un espectro de polarización a dos extremos denominados M1 y M2. Los macrófagos con fenotipo M1 están relacionados con respuestas tipo Th1 y de activación clásica con un fenotipo proinflamatorio, y los M2 con tipo Th2 y funciones como la homeostasis del tejido, reparación del daño tisular, un fenotipo tolerogénico y actividad anti-inflamatoria <sup>68,69</sup>. Mosser y colaboradores apuntan incluso a un espectro de activación más amplio (Figura 15), donde los macrófagos pueden encontrarse en una gama de activación similar a la gama cromática del espectro visible de luz <sup>68</sup>.

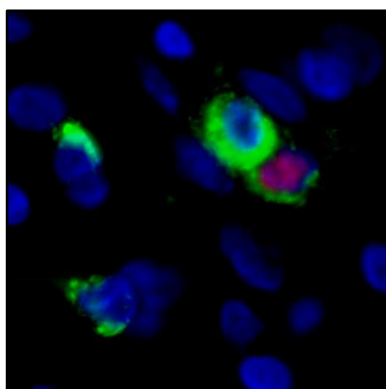


**Figura 15.** Representación lineal de los dos extremos de polarización en el espectro del fenotipo de los macrófagos, en la parte superior. Representación de los fenotipos de macrófagos empleando el espectro cromático como símil para interpretar el espectro de funciones que pueden adaptar los macrófagos, en la parte inferior. Adaptado de *Exploring the full spectrum of macrophage activation*, *Nature Reviews Immunology*, 2018.



Es por esta razón que quisimos adentrarnos en el estudio de estas subpoblaciones celulares en el contexto del trasplante renal. Mannon y Chadban, entre otros autores, revisaron la contribución de los macrófagos en la disfunción del injerto renal. Se destaca su asociación con peor evolución del injerto y su implicación en el daño agudo, dejando abierta la pregunta sobre la relevancia que pueda tener el fenotipo M2 <sup>70,71</sup>. Pero hasta nuestro conocimiento, no se ha abordado este enfoque aplicado al contexto del rechazo en el trasplante renal.

Barros y colaboradores identificaron en tejido diferentes factores de transcripción relacionados con los estados polarizados de macrófagos como son el pSTAT1 y el cMAF, que aumentan su expresión en las subpoblaciones M1 y M2, respectivamente <sup>72</sup>. El factor de transcripción STAT1 se activa por diferentes señales y se fosforila desplazándose desde el citoplasma al núcleo de la célula para así promover la polarización a la subpoblación M1. El factor de transcripción cMAF participa en la cascada de señalización de la citoquina antiinflamatoria IL10 que polariza los macrófagos a la subpoblación M2 <sup>73-75</sup>. Nuestra novedosa aproximación identifica las subpoblaciones de macrófagos polarizados a estos dos estados y no polarizados infiltrando el tejido renal del órgano trasplantado, mediante tinciones dobles con marcadores inmunofluorescentes, de manera que identificamos simultáneamente macrófagos, identificados por su expresión en membrana de la molécula CD68 y la expresión aumentada de los dos factores de transcripción descritos y localizada en el núcleo de las células CD68<sup>+</sup>.



**Figura 16.** Detalle de biopsia renal de un órgano trasplantado teñida mediante inmunofluorescencia donde se identifican macrófagos con marcador verde (FITC) y factor de transcripción cMAF en el núcleo de un macrófago polarizado a M2 en rojo (TRITC). Identificación de núcleos celulares en azul mediante DAPI.

La polarización de los macrófagos es un tema de absoluta actualidad y todavía no se ha dilucidado de manera precisa si estas subpoblaciones contribuyen a la disfunción del injerto actuando como mecanismo efector de la respuesta de rechazo y contribuyendo al deterioro de la arquitectura tisular, o bien actúan como reparadores del daño tisular,

contribuyendo a la homeostasis del tejido dañado. Hemos observado que la inflamación en el RM es más abundante que en otras situaciones de rechazo. La presencia de macrófagos en términos de células/mm<sup>2</sup> en esta entidad es también la más abundante, junto con biopsias con TCMR. En RM observamos una gran cantidad de macrófagos en estado no polarizado, donde no se identifican ninguno de los factores de transcripción estudiados, pero también una cantidad de macrófagos polarizados a M2 lo que podría significar que en una situación de rechazo con participación de ambos componentes celular y humoral, existe una señalización que lleva a algunos macrófagos a adquirir fenotipo relacionado con la homeostasis y reparación del daño tisular que se está produciendo.

En el AMR se han descrito recientemente nuevas vías en el reconocimiento del tejido alógeno mediado por anticuerpos donde las células NK tienen un papel crucial <sup>25</sup>. Los linfocitos NK reconocen a los anticuerpos por su fracción constante. A su vez, estos anticuerpos específicos han reconocido epítomos extraños en las células endoteliales del aloinjerto, células que además carecen del HLA de clase I propio al proceder del donante. Todo ello provoca una cascada de señalización que culmina con un ataque específico a la célula reconocida mediante la activación de la célula NK <sup>26</sup>. En nuestra serie, las células NK no parecen tener un papel especialmente relevante, estando muy poco representadas en los infiltrados celulares de las biopsias de injertos renales en los diferentes tipos de rechazo estudiados y aparecen a niveles sin diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. La cuantificación de estas células en las biopsias con ARM y RM, donde recordamos que subyace un componente humoral además de celular, muestra una leve tendencia a ser mayor que en los otros grupos estudiados. Sin embargo, el análisis de componentes principales (PCA) realizado incluyendo todos los grupos diagnóstico y todas las cuantificaciones de los diferentes tipos celulares, arroja resultados muy interesantes en el mismo sentido que las publicaciones previas indicando la existencia de una gran similitud entre RMA y células NK o dicho de otro modo, las células NK tienen un papel mucho más relevante en el RMA que en cualquier otro tipo de los rechazos estudiados (Publicación 1).

Respecto al análisis del infiltrado inflamatorio en el trasplante hepático, nuestro estudio se ha centrado en un rechazo mediado por células plasmáticas, anteriormente conocido como HIdn. Como hemos comentado en la introducción, se trata de una entidad en la que

se identifican características del rechazo mediado por anticuerpos de manera consensuada por la comunidad científica, en la que es cierto que se presentan características histológicas similares a fenómenos autoinmunes como las encontradas en la hepatitis autoinmune<sup>42,46</sup> y es por ello que su denominación ha seguido diferentes corrientes, como se ha explicado. Bajo nuestro punto de vista, la más acertada es la sugerida por el grupo de expertos de Banff “rechazo rico en células plasmáticas”, por resaltar el principal hallazgo histológico de infiltrados portales ricos en células plasmáticas, si bien es cierto que aceptamos que la HIdn ha sido la terminología más usada históricamente.

Los resultados publicados que conforman las Publicaciones 2 y 3 de esta tesis doctoral, apoyan firmemente la idea de que lo que subyace es un rechazo, como incluye Banff en su última actualización de criterios diagnóstico en trasplante hepático de 2016<sup>41,76,77</sup> y no un evento autoinmune, con el que los clínicos siempre han tenido sus reservas debido principalmente que la afectación original que condujo a la pérdida del hígado de los pacientes no se debía a procesos autoinmunes y a que el órgano diana de la respuesta inmune es un aloinjerto y no es un órgano propio. En este mismo sentido, se ha observado el desarrollo de HIdn en trasplante parcial de hígado de donante vivo sólo en la fracción procedente del donante<sup>48</sup>.

Además, publicaciones previas de nuestro grupo han supuesto aportaciones relevantes en favor de una respuesta mediada por anticuerpos específicos de donante no-HLA, incluyendo la identificación por primera vez de la presencia de depósitos de C4d en las áreas portales de biopsias de estos pacientes diagnosticados de HIdn y sin estar relacionados con la presencia de anticuerpos donante específicos HLA<sup>9</sup>.

Nuestro grupo ha demostrado también en los últimos años que la producción de anticuerpos específicos anti-GSTT1 sólo ocurre bajo la situación de incompatibilidad genética entre donante positivo para esta proteína y receptor nulo. En el resto de combinaciones genéticas posibles no se han encontrado dichos anticuerpos: en donante positivo y receptor positivo, en donante nulo y receptor nulo, y en donante nulo y receptor positivo.

Cabe comentar que no en todos los casos de pacientes receptores nulos con trasplante de donante positivo para la GSTT1 se desarrolla la respuesta inmune, si bien podemos afirmar que se trata de una proteína que presenta una alta inmunogenicidad.

En la biopsia hepática, poco se ha estudiado acerca de la composición de los infiltrados inflamatorios portales. Fiel y colaboradores emplearon un sistema semicuantitativo para determinar el ratio de células plasmáticas con respecto al resto de células presentes en el infiltrado portal y encontraron el resultado más alto en biopsias del momento del diagnóstico de la HIIdn, así como una disminución en biopsias posteriores de seguimiento<sup>51</sup>. Los resultados de nuestro estudio apuntan a un perfil característico de la HIIdn, donde se observa un predominio de linfocitos T (de media un 36,6% de la composición total del infiltrado inflamatorio portal), seguido de células plasmáticas (28,8%), siendo un 17% de ellas IgG4<sup>+</sup>, macrófagos (19,7%) y linfocitos B (14,9%). Como se puede apreciar, el componente humoral en términos de presencia de linfocitos B y células plasmáticas en los infiltrados portales constituye el bloque mayoritario en estas biopsias con diagnóstico de HIIdn<sup>76</sup>.

En el caso del estudio de biopsias de seguimiento, realizadas unos meses después del diagnóstico de la HIIdn y tras el tratamiento del paciente con esteroides, se puede observar una reducción importante tanto en el número absoluto como relativo de células plasmáticas en los infiltrados portales, así como en la presencia de linfocitos B, lo que demuestra la efectividad del tratamiento frente al rechazo<sup>76</sup>.

Todos estos resultados ayudan a dilucidar los mecanismos patogénicos que subyacen a este tipo de rechazo. Como hemos comentado en la introducción, durante la cirugía del trasplante, antígenos intracelulares como la GSTT1 pueden ser liberados y quedar expuestos a un posible reconocimiento por parte de las células B, lo que inicia la respuesta de rechazo explicada. Además, existe una presentación indirecta de la proteína por parte de las APC del receptor<sup>5</sup>.

Por otro lado, todavía quedan preguntas relevantes por resolver acerca de la HIIdn. Una de las más intrigantes es por qué algunos pacientes bajo la situación de incompatibilidad en GSTT1, recibiendo el trasplante de hígado de un donante con genotipo positivo, no desarrollan la respuesta B específica y no sintetizan anticuerpos específicos anti-GSTT1.

Otra circunstancia enormemente interesante que hemos podido abordar en este proyecto de investigación se trata de la primera descripción existente de una paciente que tras someterse a un TPH sufrió una HIIdn sin tener historia previa de enfermedad hepática. Desde el punto de vista inmunológico, este hallazgo tiene unas implicaciones de suma

relevancia ya que demuestra que se puede producir una respuesta inmune mediada por la incompatibilidad en GSTT1 idéntica a la que ocurre en el trasplante de órganos sólidos.

Se debe realizar un diagnóstico diferencial entre una EICH hepática y la HIdn mediante los hallazgos histopatológicos en la biopsia. En el caso de nuestra paciente de estudio, las características eran muy similares a las que se identifican en una biopsia de un paciente trasplantado hepático y no se hallaron alteraciones en los conductos biliares, propios de EICH <sup>14</sup>.

Debemos resaltar que existen diferentes eventos que pueden sensibilizar a un paciente con genotipo GSTT1 nulo en una situación previa al trasplante y que pueden desencadenar la síntesis de anticuerpos específicos anti-GSTT1. Estos eventos sensibilizantes pueden ser una transfusión sanguínea de un donante GSTT1+ y un embarazo en una paciente gestante de un feto GSTT1+. Esta segunda situación es la que concurre en el caso de la Publicación 3 de esta tesis doctoral. Una paciente sufre mieloma múltiple IgG-kappa y tras un fracasado trasplante autólogo recibe un TPH alogénico de una hermana HLA idéntica con éxito (*engraftment*) al día +14. Desafortunadamente, la hermana donante resultó ser genotipo nulo y la paciente receptora genotipo positivo para la GSTT1. La donante había sufrido eventos de sensibilización previa, como hemos comentado, muy probablemente debido a embarazos. Tras realizarse el TPH, en torno al día +160, se desencadena una respuesta de daño hepático típicamente característica de la HIdn, con signos de hepatitis lobulillar, inflamación portal, marcados signos de colestasis y disposición rosetoide de algunos hepatocitos, todo ello acompañado de hipergammaglobulinemia, una determinación en suero en ese mismo momento de anticuerpos específicos anti-GSTT1 altos (1/320), siendo otros tipos como ANA, AMA, SMA o LKM negativos, así como la elevación de enzimas hepáticas como AST y ALT.

Tras estos eventos y hallazgos, la paciente fue sometida a tratamiento con corticosteroides con buena respuesta y disminución significativa de transaminasas e IgG.

Basándonos en estudios previos de nuestro grupo en cohortes de pacientes trasplantados de progenitores hematopoyéticos, sabemos que la incompatibilidad en GSTT1 donante nulo/receptor positivo aumenta la posibilidad de desarrollar EICH hepática tanto aguda como crónica y que la presencia de anticuerpos anti-GSTT1 está asociada con EICH aguda <sup>13</sup>. Sin embargo, en la Publicación 3 de esta tesis doctoral, describimos por primera

vez el desarrollo de HIdn, indistinguible de la encontrada en el trasplante hepático, a pesar de las notables diferencias existentes entre TPH y trasplante de órgano sólido.

Este hallazgo tan relevante nos lleva a pensar que algunos de los casos con diagnóstico de EICH hepática podrían en realidad tratarse de HIdn. Sobre todo teniendo en cuenta que, como ocurre en nuestro hospital, a estos pacientes no se les suele realizar una biopsia hepática que pudiera revelar realmente los hallazgos histológicos característicos de una u otra entidad. Además, la mayoría de los casos de diagnóstico de EICH se elaboran en base a alteraciones de la función hepática apoyándose en la observación de otros tipos de EICH más fácilmente identificables, como la cutánea. Ésto tiene serias implicaciones en la evolución de los pacientes afectados, dado que los tratamientos difieren considerablemente y una terapia no adecuada puede conducir directamente a la pérdida del hígado o muerte del paciente.

La combinación de los hallazgos anatomopatológicos, la presencia o no de anticuerpos específicos de donante en suero del receptor, la evolución clínica del paciente y un estudio exhaustivo y novedoso de la presencia de numerosos tipos celulares en el tejido biopsiado de los pacientes trasplantados, aporta datos cruciales que ayudan a dilucidar el tipo de respuesta inmune que pueda estar ocurriendo en un momento determinado y los posibles mecanismos efectores que van a producir el daño al órgano trasplantado.

La cuantificación y la identificación del tipo de células que componen los infiltrados inflamatorios presentes en las muestras de tejido biopsiado bajo diferentes situaciones de rechazo en el trasplante, no sólo facilita la comparación entre los diferentes procesos inmunes sino que resulta muy útil en el seguimiento de la progresión del episodio y la respuesta al tratamiento en siguientes biopsias de seguimiento.



## Conclusiones



1. Se ha desarrollado una técnica de cuantificación celular mediante microscopía y análisis de imagen, que ha permitido un abordaje novedoso en el estudio de los infiltrados inflamatorios en biopsias de pacientes trasplantados, y cuya aplicación parece ser relevante en el apoyo al diagnóstico de rechazo.
2. Se han identificado y cuantificado las células presentes en los infiltrados inflamatorios en las categorías diagnósticas definidas según los criterios de Banff en trasplante renal. Ello ha permitido describir que el número total de células por área de tejido es mucho mayor en los casos de rechazo mixto y *borderline*, que en los de rechazo crónico y rechazo mediado por anticuerpos.
3. El número total de macrófagos que aparecen infiltrando el tejido renal del órgano trasplantado es mayor en biopsias con rechazos correspondiente a las categorías *borderline*, rechazo mediado por células T y rechazo mixto que en biopsias con rechazo mediado por anticuerpos, con rechazo crónico o aquellas que no muestran signos histológicos de rechazo.
4. La polarización de macrófagos a M1 y M2 aparece como una característica relevante en la categoría de cambios *borderline* y de rechazo mixto en aloinjertos renales. Sin embargo, no podemos extraer conclusiones con respecto a la proporción en la que se encuentran las dos subpoblaciones de macrófagos en los diferentes tipos de rechazos.
5. La infiltración celular en los casos de rechazo mixto en el trasplante renal es altamente heterogénea y no presenta un perfil celular característico, lo que probablemente se deba a que existen diferentes vías de rechazo inmunitario actuando simultáneamente.
6. En la hepatitis inmune *de novo* en el trasplante hepático, se ha identificado un perfil celular característico de los infiltrados inflamatorios portales, en el que destaca la presencia de linfocitos B y células plasmáticas. Estas evidencias han contribuido sustancialmente a que esta patología post-trasplante se conozca ahora con el nombre de “rechazo rico en células plasmáticas”.
7. El perfil celular del rechazo rico en células plasmáticas en el trasplante hepático es perfectamente distinguible del perfil que hemos descrito para el rechazo crónico ductopénico, siendo la principal diferencia la gran proporción de células plasmáticas y de linfocitos B presentes en el primero.

8. Hemos descrito por primera vez el caso de una paciente receptora de un trasplante de progenitores hematopoyéticos que ha desarrollado un cuadro similar al del rechazo rico en células plasmáticas, con un perfil celular que coincide con el descrito en el trasplante de hígado, lo que puede abrir una línea de trabajo sobre las bases patológicas de la enfermedad de injerto contra huésped hepática.



## Bibliografía

1. Nobel Prize.  
[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1912/carrel-lecture.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1912/carrel-lecture.html).  
Published 1912.
2. Nobel Prize.  
[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1980/index.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1980/index.html).  
Published 1980.
3. Sheehan D, Meade G, Foley VM, et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*. 2001;360(1):1-16. doi:10.1042/bj3600001
4. Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2000;463(3):247-283. doi:10.1016/S1383-5742(00)00050-8
5. Martínez-Bravo MJ, Sánchez B, Sousa JM, et al. T-cell allorecognition of donor glutathione S-transferase T1 in plasma cell-rich rejection. *World J Hepatol*. 2017;9(27):1115-1124. doi:10.4254/wjh.v9.i27.1115
6. Aguilera I, Wichmann I, Gentil MA, et al. Alloimmune response against donor glutathione S-transferase T1 antigen in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis*. 2005;46(2):345-350. doi:10.1053/j.ajkd.2005.04.022
7. Aguilera I, Álvarez-Márquez A, Gentil MA, et al. Anti-glutathione S-transferase T1 antibody-mediated rejection in C4d-positive renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(7):2393-2398. doi:10.1093/ndt/gfm955
8. Álvarez-Márquez A, Aguilera I, Gentil MA, et al. Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation*. 2009;87(1):94-99. doi:10.1097/TP.0b013e31818bd790
9. Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, et al. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2001;126(3):535-539.

10. Aguilera I, Sousa JM, Gavilán F, et al. Glutathione S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation. *Liver Transplant*. 2004;10(9):1166-1172. doi:10.1002/lt.20209
11. Wichmann I, Aguilera I, Sousa JM, et al. Antibodies against glutathione S-transferase T1 in non-solid organ transplanted patients. *Transfusion*. 2006;46(9):1505-1509. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00938.x
12. Martínez-Bravo MJ, Calderón-Cabrera C, Márquez-Malaver FJ, et al. Mismatch on glutathione s-transferase t1 increases the risk of graft-versus-host disease and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(9):1356-1362. doi:10.1016/j.bbmt.2014.05.008
13. Martínez-Bravo MJ, Tallón I, Espigado I, et al. Influence of glutathione S-transferase T1 donor/recipient mismatch and anti-GSTT1 antibodies in hepatic graft-versus-host-disease. *Immunol Lett*. 2011;141(1):140-144. doi:10.1016/j.imlet.2011.09.005
14. Aguado-Domínguez E, Sousa JM, Pérez-Simón JA, et al. Clinical association of anti-glutathione S-transferase T1 antibodies and de novo immune hepatitis after hematopoietic cell transplantation. *Dig Liver Dis*. 2018;50(4):418-419. doi:10.1016/j.dld.2017.12.033
15. Cuervas-Mons Martínez V. *Introducción Al Trasplante de Órganos y Tejidos*. 3ªed.; 2009.
16. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, et al. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant*. 2005;5(10):2464-2472. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01050.x
17. Sánchez-Fueyo A and Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology*. 2011;140(1):1-24. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.059.Conflicts
18. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, et al. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78(2):242-249. doi:10.1097/01.TP.0000128167.60172.CC



19. Serón D and Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: Prognostic value of structural monitoring. *Kidney Int.* 2007;72(6):690-697.  
doi:10.1038/sj.ki.5002396
20. Moreso F, Carrera M, Goma M, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation.* 2012;93(1):41-46.  
doi:10.1097/TP.0b013e31823bb647
21. Demetris A, Adams D, Bellamy C, et al. Update of the international Banff schema for liver allograft rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. 2000;31(3):792-799.
22. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol.* 1991;86(3):464-470. doi:10.1111/j.1365-2249.1991.tb02954.x
23. Katze MG, He Y and Gale MJr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9):675-687. doi:10.1038/nri888
24. Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A, et al. Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol.* 2012;73(12):1226-1232.
25. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant.* 2012;12(2):313-321. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03836.x
26. Li XC and Baldwin WM. NK cells: New partners in antibody-triggered chronic rejection. *Am J Transplant.* 2012;12(2):275-276. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03839.x
27. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant.* 2006;6(4):747-752. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01230.x
28. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999;55(2):713-723. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00299.x

29. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med*. 2003;349(2):125-138. doi:10.1056/NEJMoa035588
30. Demetris AJ and Sebagh M. Plasma cell hepatitis in liver allografts: variant of rejection or autoimmune hepatitis? *Liver Transplant*. 2008;14:750-755. doi:10.1002/lt.
31. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates Antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009;9(10):2312-2323. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02761.x
32. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44(2):411-422. doi:10.1038/ki.1993.259
33. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). In: *American Journal of Transplantation*. Vol 7. ; 2007:518-526. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x
34. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 Classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8(4):753-760. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x
35. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. In: *American Journal of Transplantation*. Vol 14. ; 2014:272-283. doi:10.1111/ajt.12590
36. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2012;12(3):563-570. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03926.x
37. Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 kidney meeting report: current Challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant*. 2017;17(1):28-41. doi:10.1111/ajt.14107

38. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, et al. The Banff 2017 kidney meeting report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell–mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. In: American Journal of Transplantation. Vol 18. ; 2018:293-307.  
doi:10.1111/ajt.14625
39. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-Van Groningen M, et al. A 2018 reference guide to the Banff classification of renal allograft pathology. Transplantation. 2018. Publish ahead of print. doi:10.1097/TP.0000000000002366
40. Demetris AJ, Batts KP, Dhillon AP, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. Hepatology. 1997;25(3):658-663. doi:10.1002/hep.510250328
41. Demetris AJ, Bellamy C, Hübscher SG, et al. 2016 comprehensive update of the Banff working group on liver allograft pathology: Introduction of antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2016;16(10):2816-2835. doi:10.1111/ajt.13909
42. Kerkar N, Hadzic N, Davies ET, et al. De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. Lancet. 1998;351(9100):409-413. doi:10.1016/S0140-6736(97)06478-7
43. Sebagh M, Castillo-Rama M, Azoulay D, et al. Histologic findings predictive of a diagnosis of de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation in adults. Transplantation. 2013;96(7):670-678. doi:10.1097/TP.0b013e31829eda7f
44. Vukotic R, Vitale G, D’Errico-Grigioni A, et al. De novo autoimmune hepatitis in liver transplant: State-of-the-art review. World J Gastroenterol. 2016;22(10):2906. doi:10.3748/wjg.v22.i10.2906
45. Gupta P, Hart J, Millis JM, et al. De novo hepatitis with autoimmune antibodies and atypical histology: A rare cause of late graft dysfunction after pediatric liver transplantation. Transplantation. 2001;71(5):664-668. doi:10.1097/00007890-200103150-00016
46. Demetris AJ and The Banff Working Group. Liver biopsy interpretation for causes of late liver allograft dysfunction. Hepatology. 2006;44(2):489-501. doi:10.1002/hep.21280

47. Pongpaibul A, Vernik R, McDiarmid S, et al. Histopathology of de novo autoimmune hepatitis. *Liver Transplant*. 2012;18:811-818.
48. Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Sakurai T, et al. De novo autoimmune hepatitis affecting allograft but not the native liver in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 2003;76(1):271-272.  
doi:10.1097/01.TP.0000072018.06230.A1
49. Andries S, Casamayou L, Sempoux C, et al. Posttransplant immune hepatitis in pediatric liver transplant recipients: Incidence and maintenance therapy with azathioprine. *Transplantation*. 2001;72(2):267-272. doi:10.1097/00007890-200107270-00018
50. Heneghan MA, Portmann BC, Norris SM, et al. Graft dysfunction mimicking autoimmune hepatitis following liver transplantation in adults. *Hepatology*. 2001;34(3):464-470. doi:10.1053/jhep.2001.26756
51. Fiel MI, Agarwal K, Stanca C, et al. Posttransplant plasma cell hepatitis (de novo autoimmune hepatitis) is a variant of rejection and may lead to a negative outcome in patients with hepatitis C Virus. *Liver Transplant*. 2008;14(6):861-871.
52. Schwartz R and Dameshek W. The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest*. 1960;39(6):952-958. doi:10.1172/JCI104116
53. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987;60(9):1249-1255.  
doi:10.7164/antibiotics.40.1249
54. Platz KP, Sollinger HW, Hullett DA, et al. RS-61443 a new potent immunosuppressive agent. *Transplantation*. 1991;51(1):27-31
55. Nobel Prize.  
[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1984/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/).  
Published 1984.

56. Nankivell BJ and Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant*. 2006;6(9):2006-2012. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01436.x
57. Magil AB. Infiltrating cell types in transplant glomerulitis: relationship to peritubular capillary C4d deposition. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(6):1084-1089. doi:10.1053/j.ajkd.2005.02.017
58. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int*. 2005;68(4):1866-1874. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00606.x
59. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, et al. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant*. 2007;7(2):385-393. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01634.x
60. Mengel M, Reeve J, Bunnag S, et al. Scoring total inflammation is superior to the current banff inflammation score in predicting outcome and the degree of molecular disturbance in renal allografts. *Am J Transplant*. 2009;9(8):1859-1867. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02727.x
61. Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, et al. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol*. 2010;38(7):1011-1025. doi:10.1177/0192623310385140
62. Bräsen JH, Khalifa A, Schmitz J, et al. Macrophage density in early surveillance biopsies predicts future renal transplant function. *Kidney Int*. 2017;92(2):479-489. doi:10.1016/j.kint.2017.01.029
63. Moreso F, Serón D, O'Valle F, et al. Immunephenotype of glomerular and interstitial infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies and histological diagnosis. *Am J Transplant*. 2007;7(12):2739-2747. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02013.x
64. Sicard A, Meas-Yedid V, Rabeyrin M, et al. Computer-assisted topological analysis of renal allograft inflammation adds to risk evaluation at diagnosis of humoral rejection. *Kidney Int*. 2017;92(1):214-226. doi:10.1016/j.kint.2017.01.011

65. Furness PN and Taub N. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: Report of the CERTPAP project. *Kidney Int.* 2001;60(5):1998-2012. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00030.x
66. Magil AB. Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplant Rev.* 2009;23(4):199-208. doi:10.1016/j.trre.2009.06.005
67. Liu W, Xiao X, Demirci G, et al. Innate NK cells and macrophages recognize and reject allogeneic nonself in vivo via different mechanisms. *J Immunol.* 2012;188(6):2703-2711. doi:10.4049/jimmunol.1102997
68. Mosser DM and Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448
69. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013;229(2):176-185. doi:10.1002/path.4133
70. Chadban SJ, Wu H, Hughes J. Macrophages and kidney transplantation. *Semin Nephrol.* 2010;30(3):278-289. doi:10.1016/j.semnephrol.2010.03.009
71. Mannon RB. Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17(1):20-25. doi:10.1097/MOT.0b013e32834ee5b6
72. Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013;8(11):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0080908
73. Martínez FO and Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6(March):1-13. doi:10.12703/P6-13
74. Cao S, Liu J, Song L, et al. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol.* 2005;174(6):3484-3492. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3484



75. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front Immunol.* 2014;5(November):1-9. doi:10.3389/fimmu.2014.00614
76. Aguado-Domínguez E, Gómez L, Sousa JM, et al. Identification of the cellular components involved in de novo immune hepatitis: a quantitative immunohistochemical analysis. *J Transl Med.* 2018;16(1):62. doi:10.1186/s12967-018-1440-8
77. Aguilera I, Aguado-Domínguez E, Sousa JM, et al. Rethinking de novo immune hepatitis, an old concept for liver allograft rejection: relevance of glutathione S-transferase T1 mismatch. *World J Gastroenterol.* 2018;24(29):3239-3249.



Anexos

## **Anexo 1**

Material suplementario de las Publicaciones

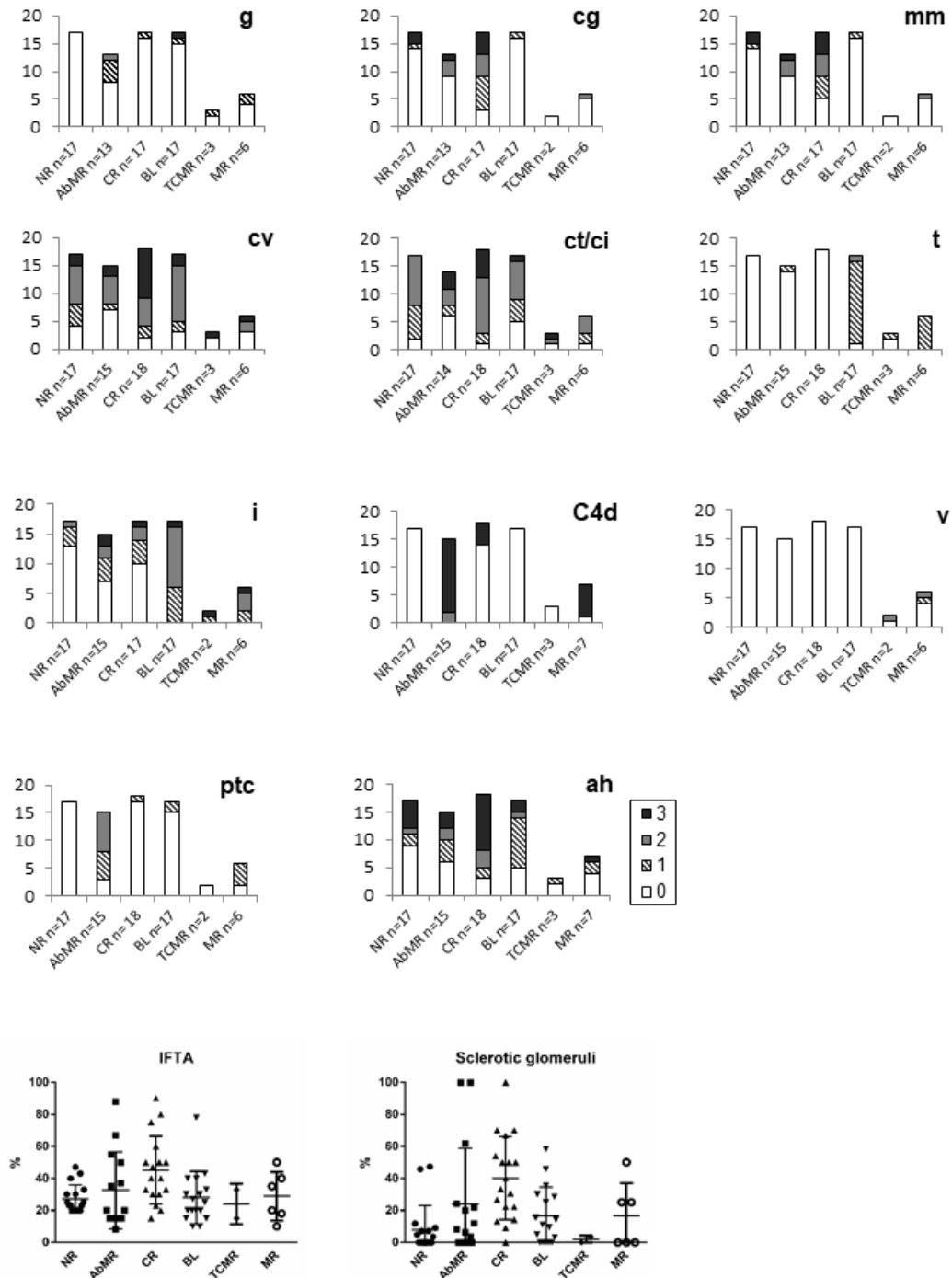
### **Material suplementario de la Publicación 1**

1. “*Cellular profiles of Banff kidney allograft rejection types through computer-assisted analysis of the inflammatory infiltrates*”

(Manuscrito en preparación para *Kidney International*).

**Supplementary Figure S1.**

Banff scores of all biopsies studies. Number of patients is specified in every group. g, glomerulitis; cg, allograft glomerulopathy; mm, mesangial matrix increase; cv, vascular fibrous intimal thickening; ct, tubular atrophy; ci, interstitial fibrosis; t, tubulitis; i, interstitial inflammation; C4d; v, intimal arteritis; ptc, peritubular capillaritis; ah, arteriolar hyaline thickening; IFTA, interstitial fibrosis and tubular atrophy. Scores are 0, 1, 2, and 3. IFTA and glomerular percentage are represented in %.





**Supplementary Table S1.**

Antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence techniques. Dilutions and conditions of the experiments are indicated. RTU: ready to use; RT: room temperature; o/n: overnight.

Target	Supplier	Reference	Host specie	Clone	Dilution	Incubation time	Incubation temperature
Anti-CD20	Dako	N1502	rabbit	polyclonal	RTU	1h	RT
Anti-CD138	Dako	M7228	mouse	MI15	1:80	o/n	4°C
Anti-CD4	Abcam	ab846	mouse	IF6	1:4	o/n	4°C
Anti-CD8	Abcam	ab93278	rabbit	EP1150Y	1:500	2h	RT
Anti-CD56	Monosan	MON9006-1	mouse	123C3	1:20	o/n	4°C
Anti-FOXP3	Abcam	ab20034	mouse	236A/E7	1:50	2h	RT
Anti-CD68	Santa Cruz Biotechnology	sc-70761	mouse	3F103	RTU	1h	RT
Anti-pSTAT1	Santa Cruz Biotechnology	sc-135648	rabbit	polyclonal	1:20	1h	RT
Anti-cMAF	Santa Cruz Biotechnology	sc-7866	rabbit	polyclonal	1:40	1h	RT



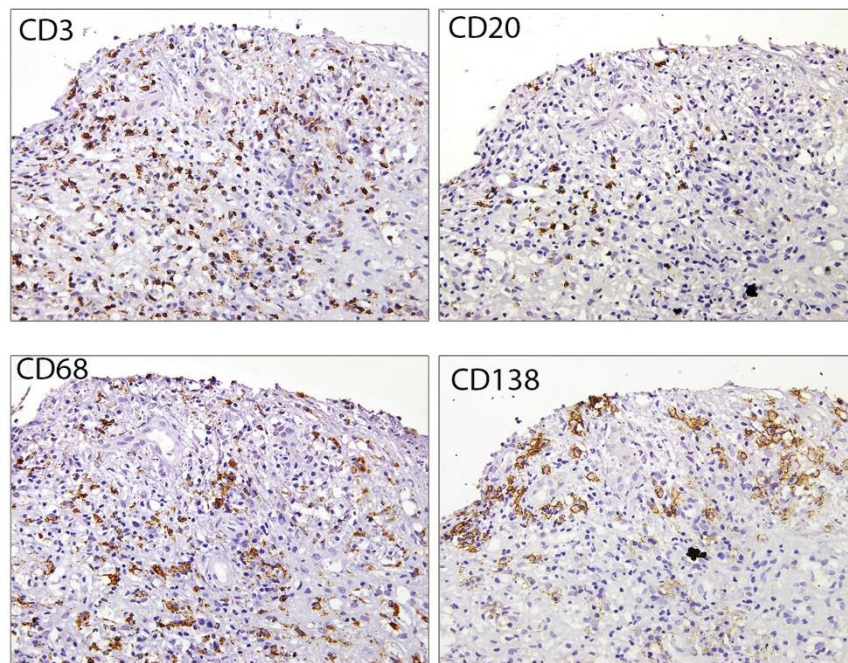
**Material suplementario de la Publicación 2**

2. *“Identification of the cellular components involved in de novo immune hepatitis:  
a quantitative immunohistochemical analysis”*

*Journal of Translational Medicine* 2018; 16(1):62

**Additional file 1: Figure S1.**

Immunostaining of sequential slides of liver tissue of patient 3 B1.

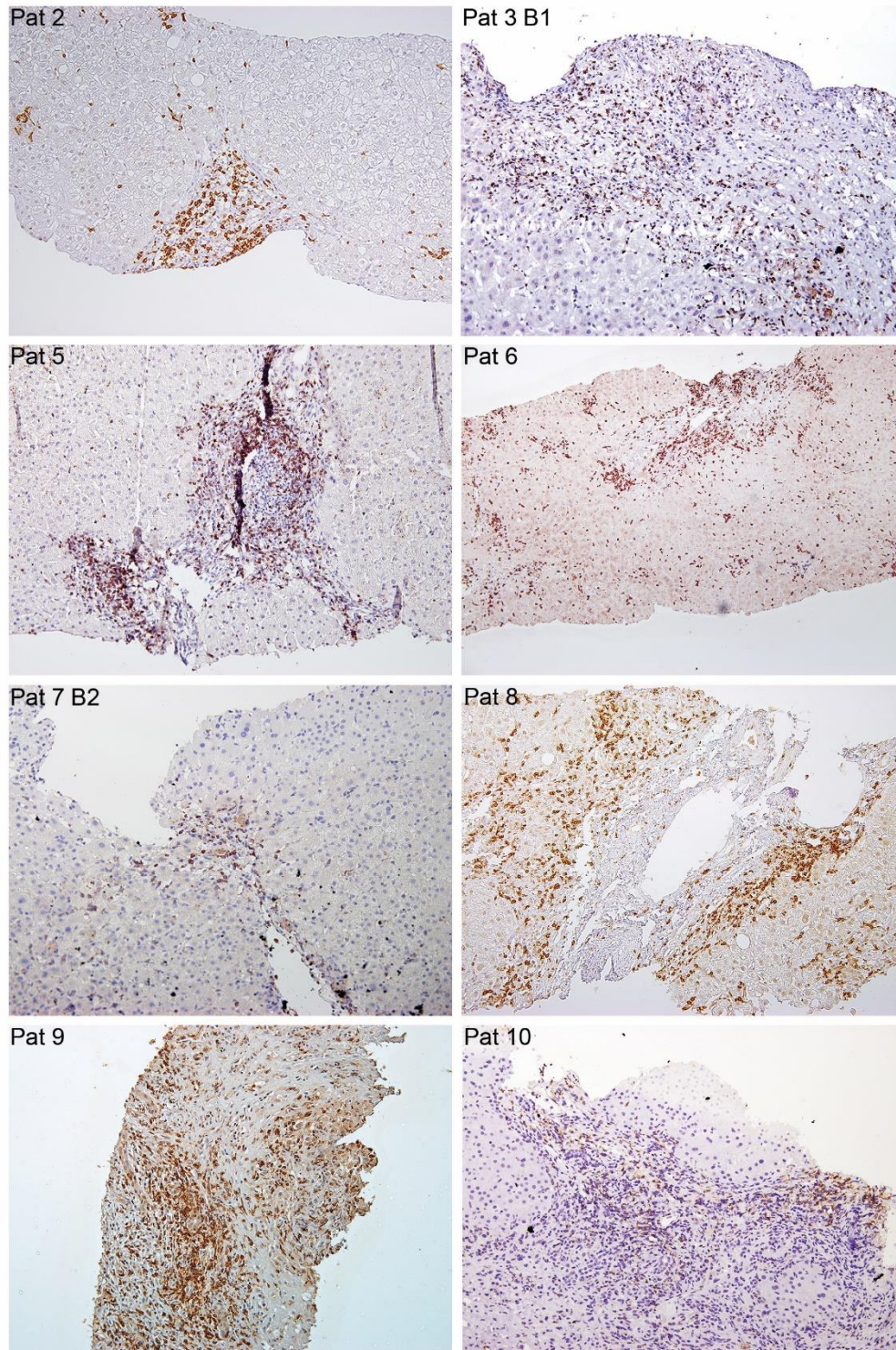




**Additional file 2: Figure S2.**

Representative images of dnIH diagnostic biopsies immunostained for CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. These cells are very abundant in the portal regions but are also disseminated in the capillary sinusoids of the entire tissue. All biopsies are shown at x200 magnification with the exception of patient 6, at x100 magnification.

**CD3**

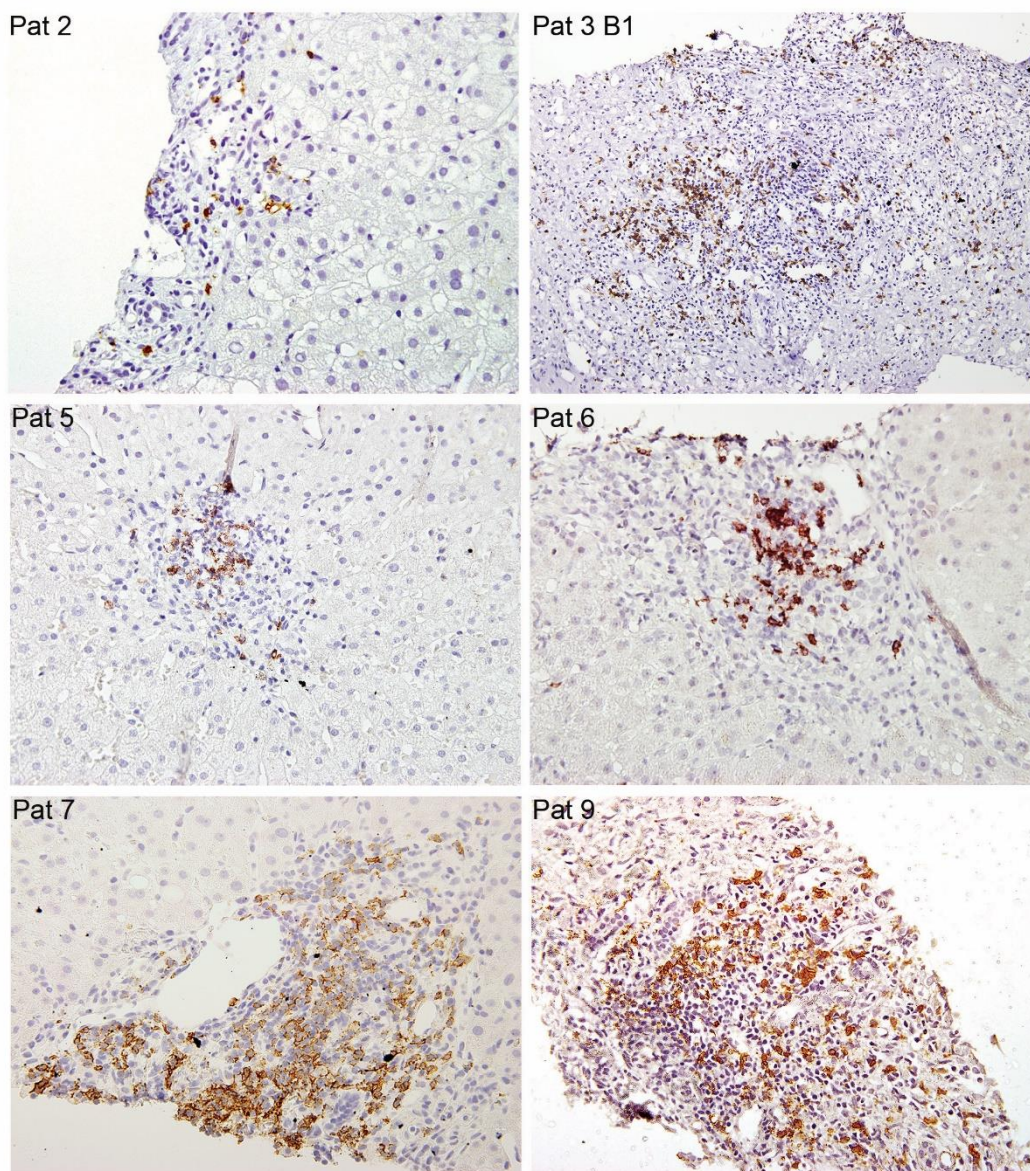




**Additional file 3: Figure S3.**

Representative images of dnIH diagnostic biopsies stained for CD20<sup>+</sup> B cells. Biopsies from patients (Pat) 2, 6 and 7 are shown at x400 and Pat 3, 5 and 9 at x200 magnification.

**CD20**

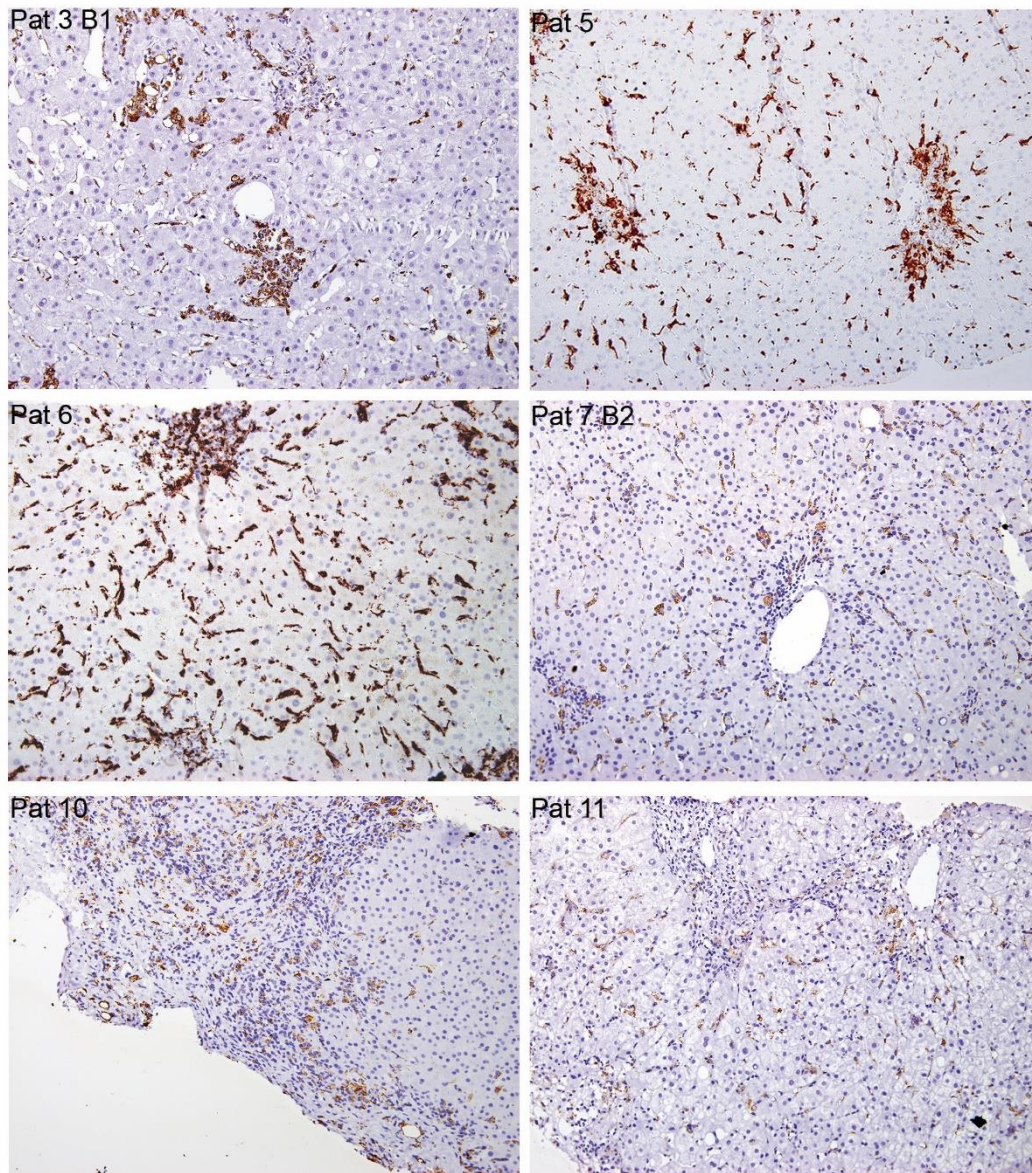




**Additional file 4: Figure S4.**

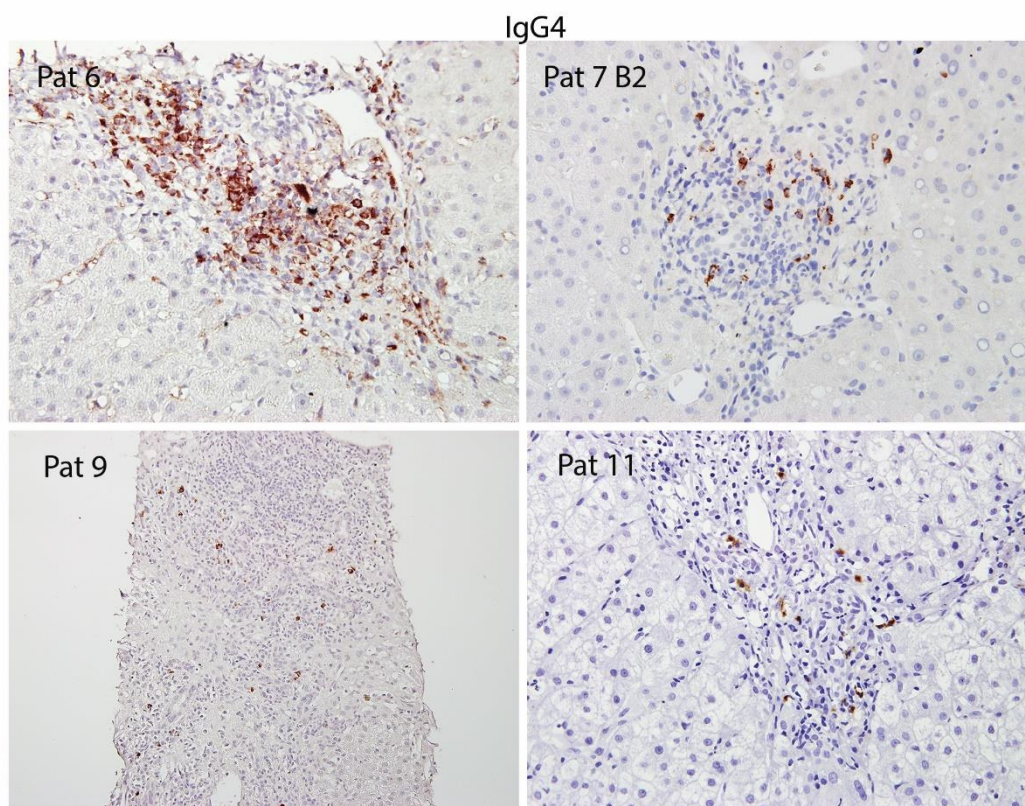
Representative images of dnIH diagnostic biopsies stained for CD68<sup>+</sup> macrophages. In some patients an accumulation of macrophages is observed in the portal areas, but in general they are in the capillary sinusoids distributed throughout the entire tissue. All biopsies are shown at x200 magnification.

**CD68**



**Additional file 5: Figure S5.**

Representative images of dnIH diagnostic biopsies stained for IgG4 plasma cells. All biopsies are shown at x400, with the exception of patient 9, at x200 magnification.





## **Anexo 2**

Comunicaciones a congresos



1. *31<sup>st</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility Conference*

*“Simultaneous liver-kidney transplant followed by chronic ductopenic rejection of the liver and antibody-mediated rejection of the kidney in the context of donor+/recipient-GSTT1 mismatch”*

Isabel Aguilera, Elena Aguado Domínguez, Cristina Abad Molina, José Manuel Sousa Martín, Miguel Ángel Gómez Bravo, Miguel Ángel Gentil Govantes y Antonio Núñez Roldán.

Celebrado en Mannheim, Heidelberg, Alemania, del 30 de mayo al 2 de junio de 2017.

2. *2017 Banff-SCT Joint Scientific Meeting, Banff Foundation for Allograft Pathology y Sociedad Catalana de Trasplantes*

*“An Accurate Method for Cell Quantification Infiltrates in Plasma Cell-Rich Rejection Liver Transplant Biopsies”*

Elena Aguado Domínguez, Lourdes Gómez, José Manuel Sousa Martín, Miguel Ángel Gómez Bravo, Antonio Núñez Roldán e Isabel Aguilera García.

Celebrado en Barcelona, España, del 27 al 31 de marzo de 2017.

3. *Spanish-Portuguese Meeting for Advanced Optical Microscopy*

*“Stereological assessment of immune cells infiltration in kidney transplant biopsies”*

Elena Aguado Domínguez, Konstantin Levitsky, Isabel Aguilera García y Antonio Núñez Roldán.

Celebrado en Bilbao, España, del 5 al 8 de octubre de 2016.

4. *30<sup>th</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility Conference*

*“Immune cells infiltration in kidney transplant biopsies”*

Elena Aguado Domínguez, Rocío Cabrera Pérez, Alejandro Suárez Benjumea, Cristina Abad Molina, Miguel Ángel Gentil Govantes, Isabel Aguilera García y Antonio Núñez Roldán.

Celebrado en Kos, Grecia, del 11 al 14 de mayo de 2016.

5. IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trasplantes.

“Relevancia de la infiltración de células del sistema inmune en tejido renal del órgano trasplantado”

Elena Aguado Domínguez, Rocío Cabrera Pérez, Alejandro Suárez Benjumea, Cristina Abad Molina, Miguel Ángel Gentil Govantes, Isabel Aguilera García y Antonio Núñez Roldán.

Celebrado en Santander, España, del 6 al 8 de mayo de 2016.

6. III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trasplantes.

*“Study of possible markers of cardiac allograft vasculopathy in early heart transplant biopsies”*

Elena Aguado Domínguez, José Manuel Sobrino Márquez, Ernesto Lage Galle, Antonio Núñez Roldán e Isabel Aguilera.

Celebrado en Valencia, España, del 8 al 10 de junio de 2014.

7. 38 Congreso Nacional de Inmunología, de la Sociedad Española de Inmunología.

*“Study of possible markers of cardiac allograft vasculopathy in early heart transplant biopsies”*

Elena Aguado Domínguez, José Manuel Sobrino Márquez, Ernesto Lage Galle, Antonio Núñez Roldán e Isabel Aguilera.

Celebrado en Badajoz, España, del 8 al 10 de mayo de 2014.





## Abreviaturas

AMR: rechazo mediado por anticuerpos, del inglés *Antibody-Mediated Rejection*

APC: célula presentadora de antígeno, del inglés *antigen presenting cell*

cMAF: factor de transcripción MAF con dominio de cremallera de leucina

DSA: anticuerpos donante específicos, del inglés *donor-specific antibodies*

FITC: fluorocromo isotiocianato de fluoresceína, con pico de emisión en 488 nm

GP: glomerulopatía

GSTT1: Glutación S-transferasa T1

HIdn: Hepatitis Inmune *de novo*

HLA: complejo mayor de histocompatibilidad humano, del inglés *Human Lukocyte Antigen*

IF: inmunofluorescencia

IFTA: fibrosis intersticial y atrofia tubular, del inglés *interstitial fibrosis and tubular atrophy*

Ig: inmunoglobulina

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleucina

kDa: kilodalton

MAT: microangiopatía trombótica

Mb: megabases

ME: muerte encefálica

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés *Mayor Histocompatibility Complex*

mm: milímetro

NK: célula *Natural Killer*

nm: nanómetro

ONT: Organización Nacional de Trasplantes

PAS: tinción de ácido periódico de Schiff, del inglés *Periodic Acid-Schiff*

PCA: análisis de componentes principales, del inglés *Principal Component Analysis*

pSTAT1: factor de transcripción STAT1, del inglés *signal transducers and activators of transcription 1*, fosforilado

RD: Real Decreto

ROI: región de interés, del inglés *Region Of Interest*

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: polimorfismo de un único nucleótido o *Single Nucleotide Polymorphism*

TCMR: rechazo mediado por células T, del inglés *T Cell-Mediated Rejection*

TCR: receptor de linfocito T, del inglés *T-Cell Receptor*

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

TRITC: fluorocromo tetrametilrodamina, con pico de emisión en 568 nm

